

**ROSI ZANONI DA SILVA**

**ESTUDO FITOQUÍMICO E BIOLÓGICO DA *Piper solmsianum* C.DC.  
VARIEDADE *solmsianum* (PIPERACEAE)**

**Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação  
em Química, Universidade Federal de Santa  
Catarina, como requisito parcial à obtenção do  
título de Doutor em Química Orgânica.**

**Orientador: Prof. Dr. Rosendo Augusto Yunes  
Co – orientadora: Dr<sup>a</sup> Vilma Edith. F. Heintz**

**FLORIANÓPOLIS**

**2006**

**ROSI ZANONI DA SILVA**

**ESTUDO FITOQUÍMICO E BIOLÓGICO DA *Piper solmsianum* C.DC.  
VARIEDADE *solmsianum* (PIPERACEAE)**

**Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação  
em Química, Universidade Federal de Santa  
Catarina, como requisito parcial à obtenção do  
título de Doutor em Química Orgânica.**

**Orientador: Prof. Dr. Rosendo Augusto Yunes  
Co – orientadora: Dr<sup>a</sup> Vilma Edith. F. Heintz**

**FLORIANÓPOLIS**

**2006**

Rosi Zanoni da Silva

**Estudo Fitoquímico e Biológico da *Piper solmsianum* C.DC. var. *solmsianum*  
(PIPERACEAE)**

Esta tese foi julgada e aprovada para obtenção do título de **Doutor em Química no  
Programa de Pós-Graduação em Química** da Universidade Federal de Santa Catarina

Florianópolis, 13 de julho de 2004.

-----  
Prof. Dr. Ademir Neves  
Coordenador do Programa

**Banca Examinadora**

-----  
Prof. Dr. Rosendo Augusto Yunes  
Orientador

-----  
Dr<sup>a</sup> Vilma Edite Fonseca Heinzen

-----  
Dr<sup>a</sup> Maysa Furlan  
(IQ – UNESP/Relatora)

-----  
Dr. Alexandre Bella Cruz  
(CCS/Farmácia – Univali)

-----  
Dr. Mauro César Marghetti Laranjeira

-----  
Dr<sup>a</sup> Inês Maria Costa Brighente

-----  
Dr. Miguel Soriano Balparda Claro

*“Se todos os esforços não foram  
devidamente reconhecidos,  
Não desanimem e lembrem que o sol ao  
nascer dá um espetáculo todo especial e,  
no entanto, a maioria da platéia continua  
dormindo.”*

**“A Deus, por iluminar minha vida  
e os caminhos que trilhei,  
para que pudesse desenvolver  
e escrever esta tese.”**

**Dedico a minha conquista com a mais profunda admiração e respeito:**

**Aos meus pais, Égdar e Nair, pelo exemplo de vida que foram, são e serão. Pelo amor e carinho com que me ensinaram a viver. Por terem sempre incentivado o meu desenvolvimento pessoal e profissional.**

**Ao meu querido esposo, Antonio Carlos, pelo amor, compreensão, apoio e por estar ao meu lado em todos os momentos desta caminhada.**

**Aos meus filhos Milene, André, Marcos e Ana Paula, pelo carinho e paciência.**

***Amo muito vocês !!!!!***

**Aos Professores Dr. Rosendo Augusto Yunes, Dr. Valdir Cechinel Filho e Dr<sup>a</sup>  
Ângela Malheiros, meus agradecimentos pelos ensinamentos, orientações e  
valiosas sugestões oferecidos durante todas as etapas deste trabalho.**

## AGRADECIMENTOS

Ao programa de pós – graduação em Química da UFSC, pela oportunidade concedida.

Ao Núcleo de Investigações Químico-farmacêuticas (NIQFAR) da Universidade do Vale do Itajaí (UNIVALI) onde realizei parte desta pesquisa e onde fui tão bem acolhida.

Ao professor Franco Della Monache, pela amizade e colaboração na obtenção dos espectros e elucidação estrutural dos compostos.

À Central de Análises da Universidade Federal de Santa Catarina – UFSC na realização das análises espectroscópicas e pelo carinho com que fui recebida durante a pesquisa.

Aos amigos do laboratório: Alexandre, Amauri, André, Ângela, Bruno, Cristiane, Danielle, Dione, Grazielle, Irma, Jacks, Karen, Louise, Louisiane, Paula, Paulo, Niero, Salete, Tânia, Tiago, Vanessa e Viviane, aos quais pude dividir minhas angustias e alegrias. Que nossa amizade fique para sempre.

Aos docentes que participaram da banca de defesa, Dr<sup>a</sup> Maysa Furlan (relatora), Dr<sup>a</sup> Vilma Edite Fonseca Heinzen, Dr<sup>a</sup> Inês Maria Costa Brighente, Dr. Alexandre Bella Cruz e Dr. Miguel Soriano Balparda Caro, pelas valiosas sugestões.

Aos funcionários, Jadir e Graça, secretários do programa de pós-graduação em Química da UFSC pela amizade e apoio prestados.

À todos os amigos que direta e indiretamente contribuíram para a realização desta pesquisa.

À CAPES pelo apoio financeiro.



## SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS .....	xii
LISTA DE ILUSTRAÇÕES .....	xiv
LISTA DE SIGLAS .....	xviii
LISTA DE SÍMBOLOS .....	xx
RESUMO .....	xxii
ABSTRACT .....	xxiv
1. INTRODUÇÃO .....	1
1.1 Introdução Geral .....	1
1.2 A Importância da Etnobotânica no Desenvolvimento de Fármacos .....	2
1.3 Fitoterápicos .....	7
1.4 O Potencial da Biodiversidade Brasileira X Mercado de Fitoterápicos .....	9
1.5 Estratégias para a Obtenção de Moléculas Bioativas de Plantas Medicinais .....	12
1.5.1 Seleção da Espécie Vegetal .....	12
1.5.2 Preparação do Material Vegetal .....	13
1.5.2.1 Local de coleta .....	13
1.5.2.2 Coleta .....	14
1.5.2.3 Dessecação do material vegetal .....	14
1.5.2.4 Moagem e pesagem do material vegetal .....	15
1.5.3 Extração .....	15
1.5.4 Concentração dos extratos .....	16
1.5.5 Semipurificação do extrato bruto .....	17
1.5.6 Marcha sistemática analítica .....	18
1.5.7 Isolamento, purificação e elucidação estrutural de compostos orgânicos .....	19
1.5.8 Modificação Estrutural e Correlação Entre Estrutura Química e Atividade Biológica .....	21
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....	23
2.1 Posição sistemática da <i>Piper solmsianum</i> C. DC. var. <i>solmsianum</i> .....	23
2.2 Sinopse da família Piperaceae .....	23
2.3 Considerações gerais do gênero <i>Piper</i> .....	25
2.4 Descrição botânica da espécie em estudo .....	25
2.5 Estudos fitoquímicos anteriores do gênero <i>Piper</i> .....	27
2.5.1 Alcalóides e Amidas .....	28
2.5.2 Lignanas e Neolignanas .....	29
2.6 Atividades biológicas de algumas espécies do gênero <i>Piper</i> .....	41
2.7 O Potencial biológico das Lignanas, Neolignanas e dos Flavonóides .....	47
2.8 Produtos Naturais X Antimicrobianos .....	49
3. OBJETIVOS .....	53
4. PARTE EXPERIMENTAL .....	54
4.1 MATERIAL E MÉTODOS .....	54
4.1.1 Equipamentos .....	54
4.1.2 Reagentes .....	54
4.1.3 Métodos Cromatográficos .....	54
4.1.3.1 Cromatografia em camada delgada (CCD) .....	54
4.1.3.2 Cromatografia em coluna (CC) .....	55
4.1.3.3 Cromatografia gasosa (CG/FID) .....	55
4.1.3.4 Cromatografia líquida de alta resolução (CLAE) .....	56

4.1.4	Identificação e Caracterização dos Compostos.....	56
4.1.4.1	Infravermelho (IV) .....	56
4.1.4.2	Espectrometria de ressonância magnética nuclear de hidrogênio e carbono-13 (RMN <sup>1</sup> H e RMN <sup>13</sup> C) .....	57
4.1.4.3	Espectrometria de massas (EM).....	57
4.2	COLETA E IDENTIFICAÇÃO DO MATERIAL VEGETAL.....	57
4.2.1	Obtenção do Extrato Metanólico.....	58
4.2.2	Partição Líquido/Líquido .....	58
4.2.3	Esquema de Fracionamento do Extrato Metanólico.....	59
4.2.4	Separação dos Constituintes das Frações Obtidas.....	59
4.2.4.1	Fração hexânica.....	59
4.2.4.1.1	Tratamento da subfração Hex-1/9 .....	60
4.2.4.1.2	Tratamento da subfração Hex-14/33 .....	60
4.2.4.1.3	Tratamento da subfração Hex-51/81 .....	61
4.2.4.2	Fração diclorometano .....	64
4.2.4.2.1	Tratamento da subfração DCM-19/21 .....	65
4.2.4.2.2	Tratamento da subfração DCM-22 .....	65
4.2.4.3	Fração acetato de etila .....	66
4.2.4.3.1	Tratamento da subfração AE- 19/21.....	66
4.2.4.3.2	Tratamento da subfração AE- 31/75.....	67
4.2.4.3.3	Tratamento da subfração AE- 49/65.....	68
4.2.4.3.4	Tratamento da subfração AE-72/101.....	68
4.3	MODIFICAÇÕES ESTRUTURAIS .....	69
4.3.1	Reação de Metilação.....	69
4.3.2	Reação de Benzoilação .....	69
4.3.3	Reação de Acetilação.....	70
4.3.4	Síntese do Diidrodiisoeugenol .....	71
4.3.5	Síntese do $\alpha$ -Di-Isoeugenol <sup>92,93</sup> .....	72
4.4	DADOS ESPECTROSCÓPICOS DOS COMPOSTOS ISOLADOS, DOS SEUS DERIVADOS E PRODUTOS DE SÍNTESE.....	73
4.4.1	Composto Hex-14/33 (Eupomatenóide-3) isolado da Fração Hexânica .....	73
4.4.2	Composto Hex-51/81 (Eupomatenóide-5) isolado da Fração Hexânica .....	73
4.4.3	Composto DCM-22 (Conocarpano) isolado da Fração Hexânica e Diclorometano .....	74
4.4.4	Composto AE – 19/21 (7- metoxi-apigenina) isolado da Fração Acetato de Etila .....	74
4.4.5	Composto AE-31/75 (Orientina) isolado da Fração Acetato de Etila .....	74
4.4.6	Composto AE - 49/65 (Hesperidina) isolado da Fração Acetato de Etila .....	75
4.4.7	Composto AE-72/101 (Luteolina-7-rutinosídeo) isolado da Fração Acetato de Etila .....	76
4.4.8	Composto ME-CON ( Conocarpano metilado).....	76
4.4.9	Composto BEN-CON (Conocarpano benzoilado) .....	77
4.4.10	Composto ACE-CON (Conocarpano acetilado) .....	77
4.4.11	Composto DHDISO (Diidrodiisoeugenol) .....	78
4.4.12	Composto DIEU ( $\alpha$ - di – isoeugenol) .....	78
4.5	MÉTODOS ANALÍTICOS EMPREGADOS NA DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DOS MARCADORES QUÍMICOS SAZONAIS PRESENTES NOS DIFERENTES ÓRGÃOS VEGETAIS DA <i>Piper solmsianum</i> C.DC. var. <i>solmsianum</i> .....	79
4.5.1	Material Vegetal.....	79

4.5.2	Extratos Vegetais.....	80
4.5.3	Preparação das Amostras para Análise em CG/FID e CLAE.....	81
4.5.4	Análises cromatográficas.....	82
4.5.5	Otimização das Condições em CG/FID.....	82
4.5.6	Otimização das Condições em CLAE.....	84
4.5.7	Curvas de Calibração das Neolignanas em CG/FID.....	85
4.5.8	Curvas de Calibração dos Flavonóides em CLAE.....	88
4.5.9	Análise Estatística.....	90
4.6	ENSAIOS BIOLÓGICOS.....	90
4.6.1	Atividade Analgésica.....	91
4.6.1.1	Tratamentos.....	91
4.6.1.2	Animais.....	91
4.6.1.3	Fármacos.....	91
4.6.1.4	Modelo de contorções abdominais induzidas pelo ácido acético.....	91
4.6.1.5	Modelo de dor induzida pela formalina.....	92
4.6.1.6	Análise estatística.....	93
4.7	ATIVIDADE ANTIMICROBIANA.....	93
4.7.1	Amostras Microbiológicas e Meios de Cultura.....	94
4.7.2	Método da Diluição em ágar para a Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM).....	95
4.7.3	Bioautografia.....	96
4.7.4	Avaliação do Possível Mecanismo de Ação Antifúngica.....	97
5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	99
5.1	MATERIAL VEGETAL E CLASSIFICAÇÃO BOTÂNICA.....	99
5.2	EXTRAÇÃO E PARTIÇÃO LÍQUIDO/LÍQUIDO.....	100
5.3	IDENTIFICAÇÃO DOS COMPOSTOS ISOLADOS NA FRAÇÃO HEXÂNICA .....	101
5.3.1	Mistura Hex – 1/9.....	101
5.3.2	Composto Hex -14/33.....	105
5.3.3	Composto Hex – 51/81.....	109
5.3.4	Composto DCM – 22.....	114
5.4	FRAÇÃO DICLOROMETANO.....	119
5.5	IDENTIFICAÇÃO DOS COMPOSTOS ISOLADOS DA FRAÇÃO ACETATO DE ETILA.....	120
5.5.1	Identificação do Composto AE – 19/21.....	120
5.5.2	Isolamento do composto AE-31/75.....	124
5.5.3	Isolamento do Composto AE - 49/65.....	129
5.5.4	Identificação do Composto AE-72/101.....	134
5.6	MODIFICAÇÕES ESTRUTURAIS NO CONOCARPANO.....	139
5.6.1	Reação de Metilação.....	140
5.6.2	Reação de Benzoilação.....	144
5.6.3	REAÇÃO DE ACETILAÇÃO.....	149
5.7	SÍNTESE DE ANÁLOGOS DO CONOCARPANO.....	153
5.7.1	Síntese do Diidrodiisoeugenol.....	153
5.7.2	Síntese do $\alpha$ -Di-Isoeugenol <sup>92,93</sup> .....	156
5.8	CONTROLE DE QUALIDADE SAZONAL DA ESPÉCIE VEGETAL <i>Piper solmsianum</i> C.DC. var. <i>solmsianum</i> .....	159
5.8.1	Rendimento dos Extratos Obtidos.....	159
5.8.2	Análises das Frações Hexânica e Diclorometano por CG/FID.....	162

5.8.2.1	Eupomatenóide – 3 como marcador químico .....	172
5.8.2.2	Eupomatenóide-5 como marcador químico .....	176
5.8.3	Análise do Extrato Acetato de Etila por CLAE .....	181
5.9	RESULTADOS DOS TESTES FARMACOLÓGICOS E BIOLÓGICOS .....	189
5.9.1	Atividade Analgésica.....	189
5.9.1.1	Efeito antinociceptivo no modelo das contorções abdominais induzidas pela injeção intraplantar de ácido acético .....	189
5.9.1.2	Efeito antinociceptivo no modelo das contorções abdominais induzidas pela injeção intraplantar de formalina.....	197
5.9.2	Atividade Antimicrobiana – CIM.....	200
5.9.2.1	Atividade antifúngica.....	201
5.9.2.2	Atividade Antibacteriana .....	203
5.9.3	Avaliação do mecanismo de ação por <i>Neurospora crassa</i> .....	206
6.	REFERÊNCIAS .....	212
7.	ANEXOS .....	226

## LISTA DE TABELAS

TABELA 1 –	Valores comerciais de alguns fármacos de origem natural <sup>22</sup> .....	7
TABELA 2 –	Número de espécies vegetais endêmicas por país/região <sup>34</sup> .....	10
TABELA 3 –	Classificação das lignanas e neolignanas em grupos <sup>65</sup> .....	30
TABELA 4 –	Grupos de lignanas e neolignanas e plantas relacionadas, segundo Parmar (1997) <sup>51</sup> .....	31
TABELA 5 –	Flavanonas de espécies do gênero <i>Piper</i> , PARMAR <i>et al.</i> (1997) <sup>51</sup> .....	38
TABELA 6 –	Flavonas de espécies do gênero <i>Piper</i> , PARMAR <i>et al.</i> (1997) <sup>51</sup> .....	38
TABELA 7 –	Concentração Inibitória Mínima (CIM) de <i>P. regnellii</i> <sup>79</sup> .....	42
TABELA 8 –	CIM e CBM dos extratos aquosos e acetato de etila das folhas de <i>P. regnellii</i> var. <i>pallescens</i> , e antibióticos de referência contra uma série de microrganismos <sup>81</sup> .....	43
TABELA 9 –	Concentrações inibitórias mínimas e concentrações mínimas bactericidas dos compostos puros e seus derivados obtidos folhas de <i>P. regnellii</i> var. <i>pallescens</i> <sup>81</sup> .....	44
TABELA 10 –	Concentração inibitória mínima (CIM) e concentração fungicida mínima (CFM) dos extratos, frações e compostos obtidos das folhas de <i>Piper regnellii</i> <sup>82</sup> .....	46
TABELA 11 –	Sistema de eluição utilizado na separação dos compostos da fração hexânica 60 .....	
TABELA 12 –	Sistema de eluição utilizado na separação dos compostos da subfração Hex-51/81 .....	63
TABELA 13 –	Sistema de eluição utilizado na purificação da subfração Hex-51/81- 50/66 .....	64
TABELA 14 –	Sistema de eluição utilizado na separação dos compostos da fração diclorometano .....	64
TABELA 15 –	Sistema de eluição usado na separação de compostos da fração AE .....	66
TABELA 16 –	Sistema de eluição utilizado na separação dos compostos da subfração AE-31/75 .....	67
TABELA 17 –	Sistema de gradiente utilizado para análise em CLAE .....	85
TABELA 18 –	Comparação dos dados de RMN <sup>1</sup> H e <sup>13</sup> C do composto Hex-14/33 com literatura <sup>57</sup> .....	108
TABELA 19 –	Comparação dos dados de RMN <sup>1</sup> H e <sup>13</sup> C do composto Hex-51/81 com literatura <sup>57</sup> .....	113
TABELA 20 –	Comparação dos dados de RMN <sup>1</sup> H e <sup>13</sup> C do composto DCM-22 com literatura <sup>57</sup> .....	118
TABELA 21 –	Comparação dos dados de RMN <sup>1</sup> H e <sup>13</sup> C do composto AE-19/21 com literatura <sup>113</sup> .....	123
TABELA 22 –	Dados de RMN <sup>1</sup> H e <sup>13</sup> C do composto AE-31/75 da literatura <sup>118</sup> .....	128
TABELA 23 –	Comparação dos dados de RMN <sup>13</sup> C e <sup>1</sup> H do composto AE-49/65 e literatura <sup>122, 125</sup> .....	133
TABELA 24 –	Comparação dos dados de RMN <sup>13</sup> C e <sup>1</sup> H do composto AE-72/101 com a literatura <sup>126</sup> .....	138
TABELA 25 –	Valores dos deslocamentos químicos (δ) de RMN <sup>1</sup> H e <sup>13</sup> C para DCM-22, Me-CON e dados da literatura para o conocarpano metilado <sup>69</sup> .....	144
TABELA 26 –	Valores dos deslocamentos químicos (δ) de RMN <sup>1</sup> H e <sup>13</sup> C para o conocarpano e o composto BEN-CON. ....	148

TABELA 27 –	Valores dos deslocamentos químicos ( $\delta$ ) de RMN $^1\text{H}$ e $^{13}\text{C}$ para o conocarpano e o composto ACE-CON .....	152
TABELA 28 –	Comparação dos dados de RMN $^{13}\text{C}$ e $^1\text{H}$ do composto DHDISO com os dados da literatura <sup>92</sup> .....	155
TABELA 29 –	Comparação dos dados de RMN $^{13}\text{C}$ e $^1\text{H}$ do composto DIEU com os dados da literatura <sup>91</sup> .....	157
TABELA 30 –	Rendimento bruto obtido dos extratos de HEX, DCM e AE obtidas <i>Piper solmsianum</i> dos diferentes órgãos vegetais coletados nas 4 estações do ano 161	
TABELA 31 –	Concentração do conocarpano (mg/mL) nas frações HEX e DCM .....	163
TABELA 32 –	Concentração (mg/mL) de orientina, hesperidina e genkwanina nos diversos órgãos vegetais nas diferentes épocas do ano.....	181
TABELA 33 –	Equações de regressão de linear e seus coeficientes de correlações (r).....	182
TABELA 34 –	Valores de concentração (mg/mL), solvente de extração, época do ano e órgão vegetal para conocarpano, eupomatenóide-3, eupomatenóide-5, orientina, Genkwanina e hesperidina.....	188
TABELA 35 –	Atividade antifúngica do extrato, frações e compostos da <i>P. solmsianum</i> C.DC. contra fungos filamentosos e expressas em concentração inibitória mínima <sup>162</sup> .....	201
TABELA 36 –	Atividade antimicrobiana de extrato, frações e compostos de <i>P. solmsianum</i> contra bactérias Gram-positivas, expressos como concentração inibitória mínima <sup>162</sup> .....	204
TABELA 37 –	Atividade antimicrobiana de extrato, frações e compostos de <i>P. solmsianum</i> contra bactérias Gram-negativas, expressos como concentração inibitória mínima.....	205
TABELA 38 –	Halo de inibição formados nos ensaios com <i>Neurospora crassa</i> para a verificação do mecanismo de ação sobre a parede celular fúngica .....	207

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1 - Previsão da expansão do mercado brasileiro de fitoterápico para o ano 2010 <sup>36</sup>	11
FIGURA 2 - Procedimentos gerais para a obtenção de compostos biologicamente ativos <sup>16</sup>	12
FIGURA 3 - Esquema geral de partição e separação provável dos principais metabólitos secundários presentes em plantas <sup>37</sup>	18
FIGURA 4 - Inflorescência em espiga da <i>Piper solmsianum</i> C.DC. var. <i>solmsianum</i> .	26
FIGURA 5 - Aspecto do ramo da <i>Piper solmsianum</i> C.DC. variedade <i>solmsianum</i> .	27
FIGURA 6 - Esqueletos de lignanas e neolignanas segundo classificação de Jensen <i>et. al.</i> (1993) <sup>65</sup>	30
FIGURA 7 - Biossíntese de (+) – conocarpano em <i>Piper regnelli</i> <sup>64, 69</sup>	34
FIGURA 8 - (a) cloreto de <i>p</i> -metoxibenzil, K <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> , irradiação de microondas, 99%; (b) TsNHNH <sub>2</sub> , etanol, refluxo, 86%; (c) sódio, metanol; (d) Bn(Et) <sub>3</sub> N <sup>+</sup> Cl <sup>-</sup> , [Ru <sup>II</sup> (TTP)(CO)], tolueno, 60-70°C, 48h, 77% (2 passos, incluindo c e d); (e) n-BuLi, THF, 0,5h; DMF, -78-25°C, 1,5h, 48%; (f) n-BuLi, THF, (Ph) <sub>3</sub> P <sup>+</sup> EtBr <sup>-</sup> , 79%; (g) PdCl <sub>2</sub> . 2CH <sub>3</sub> CN, CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> , 93%; (h) n-BuLi, (Ph) <sub>2</sub> PH, THF, 85% <sup>69</sup>	36
FIGURA 9 - Esquema de fracionamento do extrato metanólico bruto	59
FIGURA 10 - Fluxograma dos procedimentos realizados no controle de qualidade sazonal da <i>Piper solmsianum</i> var. <i>solmsianum</i> <sup>94</sup>	81
FIGURA 11 - Curva de calibração do conocarpano em diclorometano.	86
FIGURA 12 - Curva de calibração do Eupomatenóide -5 em diclorometano	87
FIGURA 13 - Curva de calibração do Eupomatenóide – 3 em diclorometano	87
FIGURA 14 - Curva de calibração da orientina em metanol	88
FIGURA 15 - Curva de calibração da Hesperidina em metanol	89
FIGURA 16 - Curva de calibração da genkwanina em metanol	89
FIGURA 17 - Cromatograma obtido por CG da mistura Hex – 1/9	101
FIGURA 18 - Cromatograma CG/EM da mistura Hex- 1/9	102
FIGURA 19 - Cromatograma CG/EM do composto Hex – 1/9 A da fração hexânica	103
FIGURA 20 - Cromatograma CG/EM do composto Hex – 1/9 B da fração hexânica	103
FIGURA 21 - Cromatograma CG/EM do composto Hex – 1/9 C da fração hexânica	104
FIGURA 22 - Cromatograma CG/EM do composto Hex – 1/9 D da fração hexânica	104
FIGURA 23 - Cromatograma por CG do composto Hex -14/33 da fração hexânica	105
FIGURA 24 - Espectro de RMN <sup>1</sup> H (300 MHz/ CDCl <sub>3</sub> ) do composto Hex – 14/33	106
FIGURA 25 - Espectro de RMN <sup>13</sup> C/DEPT (75 MHz/CDCl <sub>3</sub> ) do composto Hex – 14/33	107
FIGURA 26 - Cromatograma por CG da mistura Hex -51/81 da fração hexânica	109
FIGURA 27 - Espectro no IV (KBr) do composto Hex – 51/81	110
FIGURA 28 - Espectro de RMN <sup>1</sup> H (300 MHz/ CDCl <sub>3</sub> ) do composto Hex – 51/81	111
FIGURA 29 - Espectro de RMN <sup>13</sup> C do (75 MHz/CDCl <sub>3</sub> ) composto Hex – 51/81	112
FIGURA 30 - Espectro de RMN <sup>13</sup> C (75 MHz/CDCl <sub>3</sub> ) do composto Hex – 51/81	113
FIGURA 31 - Cromatograma por CG da mistura DCM - 22	115
FIGURA 32 - Espectro de RMN <sup>1</sup> H (300 MHz/ CDCl <sub>3</sub> ) do composto DCM-22	116
FIGURA 33 - Espectro de RMN <sup>1</sup> H (300 MHz/ CDCl <sub>3</sub> ) do composto DCM-22	116
FIGURA 34 - Espectro de RMN <sup>13</sup> C (75 MHz/CDCl <sub>3</sub> ) do composto DCM - 22	117
FIGURA 35 - Espectro de RMN <sup>13</sup> C (75 MHz/CDCl <sub>3</sub> ) do composto DCM - 22	118
FIGURA 36 - Espectro no IV (KBr) do composto AE – 19/ 21	121
FIGURA 37 - Espectro de RMN <sup>1</sup> H (300 MHz/ C <sub>5</sub> D <sub>5</sub> N) do composto AE – 19/ 21	122
FIGURA 38 - Espectro de RMN <sup>13</sup> C (75 MHz/ C <sub>5</sub> D <sub>5</sub> N) do composto AE – 19/ 21	122
FIGURA 39 - Espectro no IV (KBr) do composto AE – 31/75	125

FIGURA 40 - Espectro de RMN $^1\text{H}$ (300 MHz/ DMSO- $d_6$ ) do composto AE – 31/71 .....	126
FIGURA 41 - Espectro de RMN $^{13}\text{C}$ (75 MHz/ DMSO- $d_6$ ) do composto AE – 31/71 .....	127
FIGURA 42 - Espectro no IV (KBr) do composto AE – 49/65 .....	129
FIGURA 43 - Espectro de RMN $^1\text{H}$ (300 MHz/ $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ ) do composto AE – 49/65 .....	130
FIGURA 44 - Espectro de RMN $^1\text{H}$ (300 MHz/ $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ ) do composto AE – 49/65 (cont.)..	131
FIGURA 45 - Espectro de RMN $^{13}\text{C}$ (75 MHz/ $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ ) do composto AE – 49/65.....	132
FIGURA 46 - Espectro de RMN $^1\text{H}$ (200 MHz/ $\text{MeOH}-d_4$ ) do composto AE – 92/101 .....	135
FIGURA 47 - Espectro de RMN $^{13}\text{C}$ (50 MHz/ $\text{MeOH}-d_4$ ) do composto AE – 92/101 .....	136
FIGURA 48 - Espectro de DEPT (50 MHz/ $\text{MeOH}-d_4$ ) do composto AE – 92/101 .....	137
FIGURA 49 - Espectro no IV do composto Me-CON .....	142
FIGURA 50 - Espectro de RMN $^1\text{H}$ (300 MHz/ $\text{CDCl}_3$ ) do composto Me-CON .....	143
FIGURA 51 - Espectro de RMN $^{13}\text{C}$ (75MHz/ $\text{CDCl}_3$ ) do composto Me-CON .....	143
FIGURA 52 - Espectro no IV do composto BEN-CON.....	146
FIGURA 53 - Espectro de RMN $^1\text{H}$ (300 MHz/ $\text{CDCl}_3$ ) do composto BEN-CON.....	147
FIGURA 54 -Espectro de RMN $^{13}\text{C}$ (75 MHz/ $\text{CDCl}_3$ ) do composto BEN – CON.....	147
FIGURA 55 - Espectro no IV do composto ACE-CON.....	150
FIGURA 56 - Espectro de RMN $^1\text{H}$ (300 MHz/ $\text{CDCl}_3$ ) do composto ACE-CON.....	151
FIGURA 57 - Espectro de RMN $^{13}\text{C}$ (75 MHz/ $\text{CDCl}_3$ ) do composto ACE – CON.....	151
FIGURA 58 - Espectro de RMN $^1\text{H}$ (300 MHz/ $\text{CDCl}_3$ ) do composto DHDISO .....	155
FIGURA 59 - Espectro de RMN $^{13}\text{C}$ ( $\text{CDCl}_3$ /75 MHz) do composto DHDISO .....	156
FIGURA 60 - Espectro de RMN $^1\text{H}$ (300 MHz/ $\text{CDCl}_3$ ) do composto DIEU.....	158
FIGURA 61 - Espectro de RMN $^{13}\text{C}$ ( $\text{CDCl}_3$ /75 MHz) do composto DIEU.....	158
FIGURA 62 - Rendimento bruto (mg/mL) obtido dos extratos de HEX, DCM e AE dos diferentes órgãos da <i>P. solmsianum</i> coletados nas 4 estações do ano. ....	161
FIGURA 63 - Concentração do conocarpano (mg/mL) nas frações HEX e DCM por CG/FID. .....	164
FIGURA 64 - Comparação entre dois extratos - Hexano e DCM.....	165
FIGURA 65 - Ampliação da Figura 64 na área de interesse.....	166
FIGURA 66 - Comparação de um extrato com os padrões dos marcadores .....	167
FIGURA 67 - Concentrações médias e intervalos de confiança (barras) de conocarpano (em mg/mL) para os diferentes tipos de extração .....	167
FIGURA 68 - Concentrações médias e intervalos de confiança (barras) de conocarpano (em mg/mL) para as diferentes partes da planta.....	168
FIGURA 69 - Concentrações médias e intervalos de confiança (barras) de conocarpano (em mg/mL) para as diferentes estações do ano.....	169
FIGURA 70 - Médias e desvios padrão associados à combinação dos extratos, partes da planta e estações do ano. NOTA: o código utilizado mostra o tipo de extrato na primeira letra (D-DCM e H-Hexano), a parte da planta nas segundas e terceiras letras (RA-Raiz, FL-Flor e FO-Folha) e a estação do ano na quarta letra (O- Outono, I-Inverno, P-Primavera e V-Verão).....	170
FIGURA 71 - Rendimento médio associado à combinação dos extratos, partes da planta e estações do ano. NOTAS: o código utilizado mostra o tipo de extrato na primeira letra (D-DCM e H-Hexano), a parte da planta nas segundas e terceiras letras (RA-Raiz, FL-Flor e FO-Folha) e a estação do ano na quarta letra (O- Outono, I-nverno, P-Primavera e V-Verão). ....	172
FIGURA 72 - Concentrações médias e intervalos de confiança (barras) de eupomatenóide-3 (mg/mL) para os diferentes tipos de extração .....	172
FIGURA 73 - Concentrações médias e intervalos de confiança (barras) de eupomatenóide-3 (Eu-3 em mg/mL) para as diferentes partes da planta. ....	173



FIGURA 74 - Concentrações médias e intervalos de confiança (barras) da neolignana eupomatenóide-3 (em mg/mL) para as diferentes estações do ano. ....	174
FIGURA 75 - Médias e desvios padrão associados à combinação dos extratos, partes da planta e estações do ano. NOTAS: o código utilizado mostra o tipo de extrato na primeira letra (D-DCM e H-Hexano), a parte da planta nas segundas e terceiras letras (RA-Raiz, FL-Flor e FO-Folha) e a estação do ano na quarta letra (O-Outono, I-Inverno, P-Primavera e V-Verão). ....	175
FIGURA 76 - Rendimento médio associado à combinação dos extratos, partes da planta e estações do ano. NOTAS: o código utilizado mostra o tipo de extrato na primeira letra (D-DCM e H-Hexano), a parte da planta nas segundas e terceiras letras (RA-Raiz, FL-Flor e FO-Folha) e a estação do ano na quarta letra (O-Outono, I-Inverno, P-Primavera e V-Verão). ....	176
FIGURA 77 - Concentrações médias e intervalos de confiança (barras) de eupomatenóide-5 (em mg/mL) para os diferentes tipos de extração. ....	176
FIGURA 78- Concentrações médias e intervalos de confiança (barras) da neolignana eupomatenóide-5 (em mg/mL) para as diferentes partes da planta. ....	177
FIGURA 79 - Concentrações médias e intervalos de confiança (barras) do eupomatenóide-5 (em mg/mL ) para as diferentes estações do ano. ....	178
FIGURA 80 - Médias e desvios padrão associados à combinação dos extratos, partes da planta e estações do ano. NOTAS: o código utilizado mostra o tipo de extrato na primeira letra (D-DCM e H-Hexano), a parte da planta nas segundas e terceiras letras ( RA - Raiz, FL-Flor e FO - Folha ) e a estação do ano na quarta letra ( O - Outono, I- Inverno, P- Primavera e V – Verão). ....	179
FIGURA 81 - Rendimento médio associado à combinação dos extratos, partes da planta e estações do ano. NOTAS: o código utilizado mostra o tipo de extrato na primeira letra ( D - DCM e H - Hexano), a parte da planta nas segundas e terceiras letras (RA-Raiz, FL-Flor e FO-Folha) e a estação do ano na quarta letra (O-Outono, I - Inverno, P-Primavera e V-Verão). ....	180
FIGURA 82 - Concentração (mg/mL) de orientina, hesperidina e genkwanina nos diversos órgãos vegetais da <i>P. solmsianum</i> C.DC. nas diferentes épocas do ano. ....	182
FIGURA 83 - Cromatograma CLAE do extrato AE das folhas de primavera de <i>P. solmsianum</i> demonstrando os tempos de retenções para a orientina, hesperidina e genkwanina. ....	183
FIGURA 84 - Espectro no ultravioleta indicando os comprimentos de onda em nm dos marcadores químicos orientina (56), hesperidina (57) e genkwanina (58) identificados no extrato AE das folhas de primavera de <i>P. solmsianum</i> . ....	183
FIGURA 85 - Espectro no UV (256,6 nm) e cromatograma do padrão da orientina (17 ± 1,5 min). ....	184
FIGURA 86 - Espectro no UV (284,5 nm) e cromatograma do padrão da hesperidina (39 ± 0,5 min) . ....	184
FIGURA 87 - Espectro no UV (267,9nm) e cromatograma do padrão da genkwanina (50,97 min). ....	185
FIGURA 88 - Gráfico da concentração dos marcadores químicos (mg/mL) X órgão vegetal . ....	186
FIGURA 89 - Concentração de orientina nas folhas (mg/mL)X estações do ano . ....	186
FIGURA 90 - Concentração de hesperidina (mg/mL) nos vários órgãos vegetais X época do ano. ....	187
FIGURA 91 - Concentração de genkwanina nos vários órgãos vegetais X época do ano ....	187

FIGURA 92 - Efeito analgésico das frações de <i>P. solmsianum</i> C.DC. pela via intra peritoneal. As colunas e barras verticais representam a média s.e.m. ** P<0,01 – indicativo de significância. ....	190
FIGURA 93 - Efeito antinociceptivo da orientina pela via sistêmica, em relação às contorções abdominais induzidas pela injeção do ácido acético (0,6 %) em camundongos em relação ao controle. As colunas e barras verticais representam a média ± e.p.m. ** P<0,01 – indicativo de significância. ....	190
FIGURA 94 - Efeito antinociceptivo causado pela orientina administrada pela via oral em relação às contorções abdominais causada pela injeção de ácido acético (0,6 %) em camundongos. As colunas e barras verticais representam a média ± e.p.m. * P < 0,05 , ** P<0,01. ....	191
FIGURA 95 A e B - Efeito antinociceptivo tempo-dependente causado pela orientina administrada pela via intraperitoneal em relação às contorções abdominais causadas pela injeção de ácido acético em camundongos. As colunas e barras verticais representam a média ± e.p.m. ** P< 0,01, *** P < 0,001 – indicativo de significância. ....	192
FIGURA 96 - Efeito antinociceptivo causado pelo conocarpano administrado pela via intraperitoneal em relação às contorções abdominais causada pela injeção de ácido acético (0,6 %) em camundongos. As colunas e barras verticais representam a média ± e.p.m. * P < 0,05 , ** P<0,01. ....	193
FIGURA 97 - Efeito antinociceptivo causado pelos derivados do conocarpano administrado pela via intraperitoneal em relação às contorções abdominais causada pela injeção de ácido acético (0,6 %) em camundongos. As colunas e barras verticais representam a média ± e.p.m. * P < 0,05 , ** P<0,01. ....	194
FIGURA 98 - Efeito antinociceptivo causado pelo conocarpano e seus derivados administrado pela via intraperitoneal em relação às contorções abdominais causada pela injeção de ácido acético (0,6 %) em camundongos. NOTAS: as colunas e barras verticais representam a média ± e.p.m. * P < 0,05 , ** P<0,01. ....	195
FIGURA 99 - Efeito antinociceptivo causado pelo α - di isoeugenol administrado pela via intraperitoneal em relação às contorções abdominais causada pela injeção de ácido acético (0,6 %) em camundongos. As colunas e barras verticais representam a média ± e.p.m. * P < 0,05 , ** P<0,01. ....	196
FIGURA 100 - Efeito antinociceptivo causado pelo diidrodiisoeugenol administrado pela via intraperitoneal em relação às contorções abdominais causada pela injeção de ácido acético (0,6 %) em camundongos. As colunas e barras verticais representam a média ± e.p.m. * P < 0,05 , ** P<0,01. ....	196
FIGURA 101 A e B - Efeito antinociceptivo causado pelas frações hexano, diclorometano e acetato de etila da <i>P solmsianum</i> C.DC pela via intraperitoneal da dor induzida pela formalina (2,5 %). As colunas e barras verticais representam a média ± e.p.m. * P<0,05, ** P < 0,001 – indicativo de significância. ....	198
FIGURA 102 A e B - Efeito antinociceptivo dose-dependente causado pela orientina isolada da fração AE da <i>Piper solmsianum</i> C.DC. pela via intraperitoneal da dor induzida pela formalina (2,5%).....	199

## LISTA DE SIGLAS

AE	–	Acetato de etila
ANVISA	–	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
CBA	–	Centro de Biotecnologia da Amazônia
CC	–	Cromatografia em coluna
CCD	–	Cromatografia em Camada Delgada
CG	–	Cromatografia gasosa
CGAR	–	Cromatografia gasosa de alta resolução
CGAR/EM	–	Cromatografia gasosa de alta resolução acoplada à espectrometria de massas CG/ES - Espectroscopia de massas
CG/FID	–	Comatografia gasosa de alta resolução com detector de ionização de chama
CIM	–	Concentração Inibitória Mínima
CLAE	–	Cromatografia líquida de alta eficiência
CV	–	Coeficiente de variância
DCM	–	Diclorometano
DI	–	Dose de inibição
DEPT	–	reforço sem distorção por transferência de polarização
EM	–	espetrometria de massas
IM	–	Inibição Média
IV	–	Espectroscopia de Infravermelho
HPLC	–	High Performance Liquid Chromatography (cromatografia líquida de alta eficiência)
HIV	–	Virus da Imunodeficiência Humana
ip	–	Intraperitoneal
NQFAR	–	Núcleo de Investigação de Química Farmacêutica
OMS	–	Organização Mundial da Saúde
P.A.	–	para análise
P.F.	–	ponto de fusão

pH	–	potencial de hidrogênio
ppm	–	Partes por milhão
<i>a posteriori</i>	–	posterior
QPN	–	Química de Produtos Naturais
RDC	–	Resolução da Diretoria Colegiada da Agência Nacional de Vigilância Sanitária
R <sub>f</sub>	–	Relação de frente
SBQ	–	Sociedade Brasileira de Química
TMS	–	Tetrametilsilano
Tr	–	Tempo de retenção
UV	–	Ultravioleta
UV-VIS	–	energia eletromagnética compreendida entre a ultravioleta e visível
v/v	–	volume por volume

## LISTA DE SÍMBOLOS

cm <sup>-1</sup>	–	Centímetros recíprocos
eV	–	Eletrovolts
G	–	Grama
°C	–	grau centígrado
Kg	–	Kilograma - 1 kg = 1000 g
KOH	–	Hidróxido de potássio
HCl	–	Ácido clorhídrico
Hz	–	Hertz
μ	–	micron – 10 <sup>-6</sup> m = 0,000001
μg	–	Micrograma = 10 <sup>-6</sup> g
μL	–	microlitro = 10 <sup>-6</sup> L
μm	–	Micrômetro ou micra
m	–	mili – 10 <sup>-3</sup> = 0,001
mg	–	miligrama - 1 g = 1000 mg ou 10 <sup>-3</sup> g
M	–	mega - 10 <sup>6</sup> = 1 000 000
MHz	–	Megahertz
min	–	Minuto
mL	–	mililitro = 10 <sup>-3</sup> L
n	–	nano - 10 <sup>-9</sup> = 0,000 000 001
nm	–	nanômetro (10 <sup>-9</sup> m)
mMol	–	milimol - concentração molar - 6,0221367 × 10 <sup>23</sup> átomos
(R)	–	do latim <i>rectus</i> = direita. Sentido horário
RMN <sup>13</sup> C	–	Ressonância magnética nuclear de carbono 13
RMN <sup>1</sup> H	–	Ressonância magnética nuclear de hidrogênio 1
(S)	–	do latim <i>sinister</i> = esquerda. Sentido anti-horário
US\$	–	Dólar
%	–	por cento
δ	–	deslocamento químico

$\phi$	– Diâmetro
T	– Transmitância

## RESUMO

O presente trabalho envolveu processos de extração, isolamento, purificação e identificação dos constituintes químicos das folhas de outono da *Piper solmsianum*. Da fração hexânica foram isoladas três neolignan benzo-furânicas denominadas de euponatenóide-3, eupomatenóide-5 e conocarpano. Da fração diclorometano foi isolado o conocarpano. Na fração acetato de etila foram detectados as flavonas 7-metoxi-apigenina (genkwanina) e a orientina e duas flavanonas hesperidina e luteolina-7-rutinosídeo. O conocarpano foi submetido a reações de metilação, benzoilação e acetilação e obteve-se os derivados: conocarpano metilado, conocarpano benzoilado e conocarpano acetilado, os quais foram avaliados quanto ao potencial analgésico e observou-se que o conocarpano cetilado foi mais ativo que os demais. Por reações de dimerização oxidativa do isoeugenol obteve-se dois análogos ao conocarpano o  $\alpha$ -di-isoeugenol e o diidrodiisoeugenol, os quais demonstram significativa atividade analgésica. Todos estes compostos foram identificados por análises de espectroscopia no IV, de RMN  $^1\text{H}$ , de RMN  $^{13}\text{C}$  e por comparação com os dados existentes na literatura.

Os testes para atividade antinociceptiva no modelo experimental das contorções abdominais induzidas pelo ácido acético pelas vias intraperitoneal e oral demonstraram que as frações diclorometano e acetato de etila apresentaram uma atividade significativa enquanto a fração hexânica foi inativa. No modelo experimental da dor induzida pela formalina administrada via intraperitoneal as frações acetato de etila e diclorometano causaram inibição significativa em ambas as fases da dor e a fração hexânica apresentou inibição significativa apenas na segunda fase desse modelo. A atividade analgésica da fração diclorometano foi associada ao conocarpano enquanto que a atividade analgésica da fração acetato de etila deve-se a orientina.

O extrato metanólico bruto, frações hexano, diclorometano e acetato de etila, e os compostos eupomatenóide-5, conocarpano e a orientina demonstraram pronunciada ação antifúngica contra todos os fungos dermatófitos testados. O conocarpano apresentou potência antifúngica tão alta quanto o fármaco padrão Cetoconazol. O

conocarpano também demonstrou atividade contra todas as leveduras testadas. Somente o conocarpano foi capaz de inibir fungos dos gêneros *Aspergillus* e *Candida*.

Os ensaios por bioautografia apresentaram 3 zonas distintas de inibição. O extrato metanólico bruto, frações hexano, diclorometano e acetato de etila e os compostos puros eupomatenóide-5 e conocarpano demonstraram excelente atividade antibacteriana, particularmente contra bactérias Gram-positivas *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus saprophyticus* and *Streptococcus agalactiae*, entretanto não foram ativos contra bactérias Gram-negativas.

O presente trabalho estabeleceu um estudo comparativo dos diferentes órgãos vegetais (raiz, caule, folha e flor) da *Piper solmsianum* nas quatro estações do ano quanto à presença dos marcadores químicos sazonais eupomatenóide-3, eupomatenóide-5 e conocarpano por CG/FID e orientina, hesperidina e 7-metoxi-apigenina (Genkwanina) por CLAE. Os resultados obtidos demonstram que as maiores concentrações do conocarpano são nas raízes de outono e flores de verão, eupomatenóide-3 nas flores de outono e eupomatenóide -5 nas flores de verão, orientina nas folhas de outono e folhas de primavera, a hesperidina nas folhas de primavera e a genkwanina nas flores de verão.

Palavras-chave: *Piper solmsianum*, Piperaceae, conocarpano, orientina.



## ABSTRACT

The present work covers the extraction, isolation, purification and identification of the chemical compounds from autumn leaves of *Piper solmsianum*. From the hexane fraction it has been isolated of three dihydrobenzofuran neolignans identified as eupomatenoid-3, eupomatenoid-5 and conocarpan. From the dichloromethane fraction it has been isolated the conocarpan. From the ethyl acetate fraction it has been isolated the flavones: orientin and 7-methoxy-apigenin (genkwanin) and two flavanones: hesperidin and luteolin-7 rutinoside. Conocarpan has been undergone to a methylation reaction, to a benzylation reaction and to an acetylation reaction and it has been the derivatives: methylated conocarpan, benzyolated conocarpan and acetylated conocarpan which have been evaluated regarding its analgesic potential and it has been remarked that the acetylated conocarpan has been the most active one among the others. Through reactions of isoeugenol oxidative dimerization it has been gotten two alike conocarpan compounds: the  $\alpha$ -di-isoeugenol and the dehydrodiisoeugenol compounds, which showed an important analgesic activity. All these compounds have been identified in the IR, of RMN<sup>1</sup>H, of RMN<sup>13</sup>C spectroscopic analyses and comparison with existing data in the literature.

The tests for antinociceptive activity in the experimental model in writhing, showed that the dichloromethane and ethyl acetate fractions presented a very significant activity while the hexanic fraction got inactive. In the experimental model of writhing, the dichloromethane and ethyl acetate fractions caused an important inhibition in it, and the hexanic fraction presented significant inhibition just in the second phase of this model. The analgesic activity of dichloromethane fraction was associated to the conocarpan, while the analgesic activity was associated to the orientin.

The crude methanolic extract, the hexane fractions, the dichloromethane and ethyl acetate fractions, the eupomatenoid-5 compounds, conocarpan and orientin, all exhibited sharp antifungal action against all the tested dermatophytes. Conocarpan presented so high antifungal strength as the standard drug ketoconazole. Conocarpan

also exhibited activity against all the tested yeasts. Conocarpan was the only compound capable to inhibit the *Aspergillus* and *Candida* fungi.

The essays through bioautographic disclosed three distinct inhibition zones. The crude methanolic extract, the hexane fractions, the dichloromethane and ethyl acetate fractions, the pure eupomatenoid-5 compounds and conocarpan exhibited excellent antibacterial activity, especially against the *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus saprophyticus* and *Streptococcus agalactiae* Gram-positive bacteria; however they were not active against the Gram-negative bacteria.

Present work established a comparative study among the different vegetable organs such as, root, stem, leaf and flower of *Piper solmsianum* in the four seasons of the year regarding the presence of the seasonal chemical markers: eupomatenoid-3, eupomatenoid-5, and conocarpan, through GC/DIF and orientin, hesperidin and 7-methoxy-apigenin (genkwanin) over HPLC. The obtained results show that the major concentrations of conocarpan is in the roots in the autumn, in the flowers in the summer. The eupomatenoid-3 is in the flowers in the autumn and the eupomatenoid-5 is in the flowers in the summer. Orientin is in the leaves in the autumn and in the spring. Hesperidin is in the leaves in the spring and genkwanin in the flowers in the summer.

Key-words: *Piper solmsianum*, Piperaceae, conocarpan, orientin.

# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1 INTRODUÇÃO GERAL

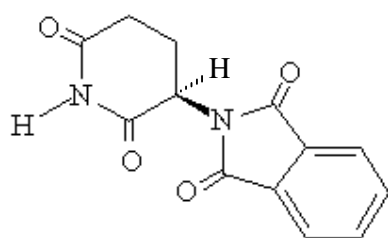
Convivendo com as plantas medicinais desde os primórdios das civilizações, os homens aprenderam a reconhecer, a respeitar, a usar suas propriedades curativas e inclusive a ter cuidados especiais com aquelas que eram tóxicas. O processo de evolução da "arte da cura" se deu de forma empírica, em processos de descobertas por tentativas, de erros e acertos. Primeiramente ocorreu através da observação do comportamento dos animais e na seqüência, pelo desenvolvimento do poder intuitivo, que é inerente do ser humano<sup>1</sup>.

Neste processo os povos primitivos propiciaram a identificação de espécies e de gêneros vegetais bem como das partes dos vegetais que se adequavam ao uso medicinal, do reconhecimento do habitat e da época da colheita. Após a identificação, vieram as técnicas de extrair sucos, secar folhas e raízes, triturar sementes e técnicas de conservação, que iriam iniciar a configuração de um corpo teórico-prático do conhecimento que constituíram a medicina do homem primitivo. Desta forma, povos inteiros dominavam seus segredos, os quais foram transmitidos de geração a geração chegando assim até os dias atuais e, desta forma preservando-os<sup>2</sup>.

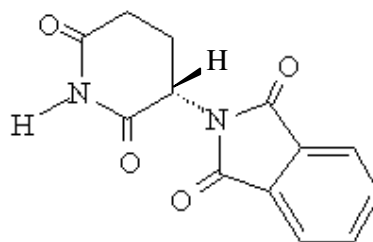
A partir da Segunda Guerra Mundial, com o advento da química moderna e culminando com a era da industrialização, as plantas medicinais ficaram no esquecimento. Os medicamentos obtidos por síntese química, começaram a ter ampla aceitação tanto no meio farmacêutico como no âmbito médico, devido a uma metodologia de investigação embasada em ensaios pré-clínicos, clínicos e toxicológicos, permitindo chegar a um produto final com todas as garantias necessárias para a saúde da população<sup>1</sup>.

Porém, após o episódio ocorrido com fármaco talidomida na década de 60, devido a sua prescrição como sedativo e agente anti-náuseoso, indicada mundialmente no alívio do mal-estar matinal comum em gestantes, resultou no nascimento de milhares de crianças com deformações congênitas, fora os natimortos. Esta tragédia

ocorreu devido a comercialização deste fármaco como mistura racêmica. Evidenciou-se que o isômero (R) talidomida (**1**) tem propriedades sedativas e hipnóticas, enquanto que o isômero (S) (**2**) possui adicionalmente propriedades teratogênicas<sup>3,4</sup>. Este fato propiciou a criação dos primeiros comitês de farmacovigilância e assim, os devidos questionamentos a respeito da confiabilidade das metodologias de investigação empregadas até então. Neste complexo contexto, começou a ressurgir a curiosidade e interesse por parte dos pesquisadores de produtos naturais, em virtude do acúmulo de substâncias enantioméricas puras encontradas nos seres vivos. A pureza enantiomérica se deve a especificidade estereoquímica nos sistemas biológicos<sup>5,6</sup>.



(R) Talidomida (**1**)



(S) Talidomida (**2**)

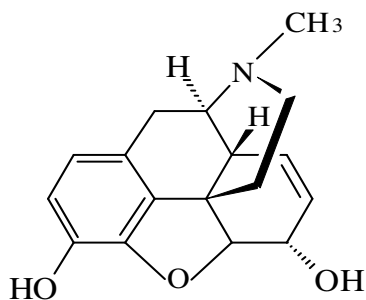
Dentre os diversos reinos existentes na natureza, os vegetais é que tem contribuído de forma mais significativa para o fornecimento de moléculas bioativas. Sendo assim, nos anos 60, o Instituto Nacional da Saúde norte-americana saiu a busca de princípios ativos que fossem úteis em especial na oncologia. Paulatinamente, através das pesquisas fitoquímicas, os princípios ativos das plantas foram isolados, purificados e identificados, descobrindo-se moléculas não só úteis na oncologia, mas também para a prevenção e tratamento de outras patologias, e assim, proporcionando uma melhor qualidade de vida para a população<sup>1</sup>. Este dado pode ser melhor constatado quando observa-se o aumento significativo da expectativa de vida ocorrido nas últimas décadas.

## 1.2 A IMPORTÂNCIA DA ETNOBOTÂNICA NO DESENVOLVIMENTO DE FÁRMACOS

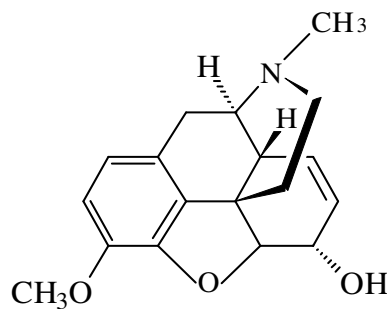
Os conhecimentos etnobotânicos (cultura popular) freqüentemente guiam as pesquisas com produtos naturais, e podem contribuir sobremaneira para a descoberta de fármacos, pois fornecem indicações preciosas a respeito das propriedades terapêuticas de espécies vegetais medicinais para cientistas e empresas<sup>7, 8</sup>.

Estima-se que aproximadamente 25% dos medicamentos prescritos mundialmente são de origem vegetal, com 120 substâncias ativas utilizadas na terapêutica, as quais foram extraídas de 90 espécies vegetais e ainda, um significativo número de fármacos sintéticos, obtidos a partir de precursores naturais<sup>9,10, 11</sup>.

Entre os exemplos de fármacos em uso, baseados em práticas etnomedicinais pode-se citar: os alcalóides extraídos do ópio (látex da papoula - *Papaver somniferum* L.), como a morfina (**3**) com potente ação hipnoanalgésica e a codeína (**4**) alcalóide de ação antitussígena. O conhecimento da morfina em terapia é milenar. Há relatos que datam de 4.000 anos, dos sumérios na Babilônia que aludem ao uso da morfina como analgésico e indutor do sono. Em 1805, o farmacêutico alemão Setürner, isolou a morfina do ópio<sup>12</sup>.

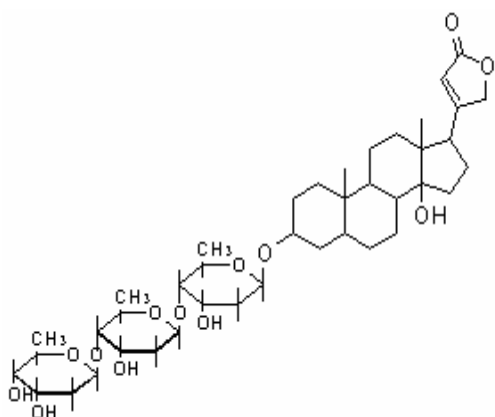


Morfina (**3**)

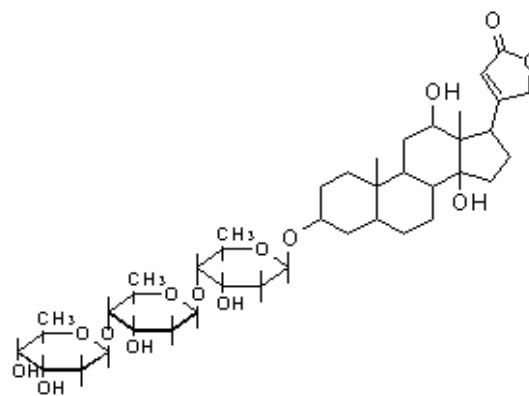


Codeína (**4**)

Em 1775, William Withering, médico inglês, teve conhecimento por um curandeiro que as folhas de *Digitalis purpurea* eram muito eficazes para o tratamento do edema causado pela insuficiência cardíaca congestiva, transtorno produzido pelo bombeamento deficiente do coração. Ao tratar os seus pacientes com as folhas da dedaleira, Withering descobriu nelas um poderoso efeito cardiotônico. Desde então, tem-se isolado, a partir das folhas de *Digitalis purpurea* a digitoxina (**5**) e da *Digitalis lanata* a digoxina (**6**)<sup>9, 13</sup>.



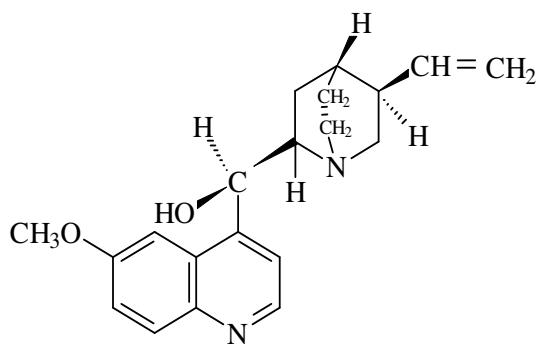
Digitoxina (5)



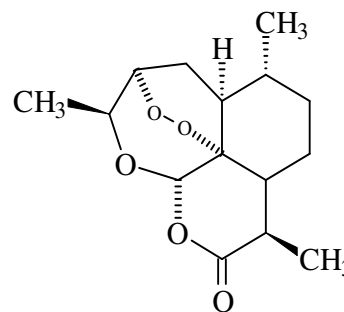
Digoxina (6)

A quinina (7) um alcalóide quinolínico, foi extraído em 1820 pelos farmacêuticos franceses Pelletier e Caventou das cascas da árvore do gênero *Cinchona* (Rubiaceae). A quinina é um agente antimalárico que vem sendo usado durante centenas de anos na América do Sul, pelos índios da região andina do Peru e da Bolívia<sup>13,14</sup>.

A artemisinina (8) é uma lactona sesquiterpênica com um grupo endoperóxido essencial à sua atividade, foi isolada em 1972 pelos cientistas chineses, das folhas e flores de *Artemisia annua* L. (Asteraceae). Esta espécie vegetal é utilizada por mais de 2000 anos na medicina Chinesa como antifebrífugo e no tratamento da malária. Constitui-se em uma nova classe de composto, com atividade potente contra o *Plasmodium falciparum*, parasita sangüíneo causador da malária e responsável pela morte de dois milhões de pessoas todos os anos<sup>14, 15, 16</sup>.

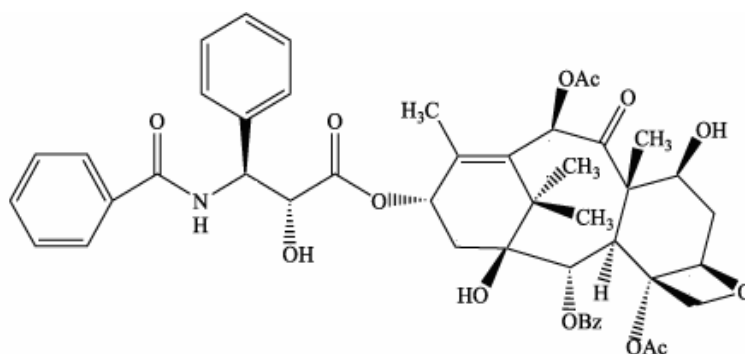


Quinina (7)



Artemisinina (8)

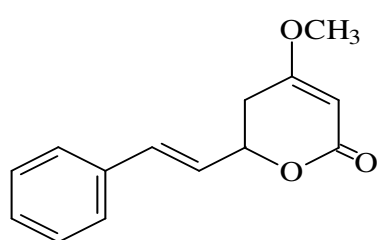
O taxol (**9**) é um diterpeno citotóxico isolado das entrecascas de *Taxus brevifolia* Nutt (Taxaceae) e constitui-se em um agente antineoplásico importante e eficiente, sua ação ocorre pela inibição do fuso mitótico, dimerização da tubulina e estabilização dos túbulos, protegendo-os da despolarização e assim, o bloqueio da multiplicação celular por interromper a divisão celular na metáfase<sup>17</sup>. Após 20 anos de pesquisas, obteve-se o Paclitaxel (Taxol<sup>®</sup>) por semi-síntese em escala industrial, sendo atualmente empregado terapêuticamente para o tratamento de câncer ovariano, mamário e pulmonar, também vem sendo usado no revestimento das endopróteses vasculares (stent)<sup>18</sup>. Recentemente foi introduzido no mercado farmacêutico um outro derivado semi-sintético do taxol, denominado Docetaxol (Taxotere<sup>®</sup>), sendo mais solúvel em água e cerca de duas vezes mais potente que o composto natural<sup>13, 14, 16, 17</sup>.



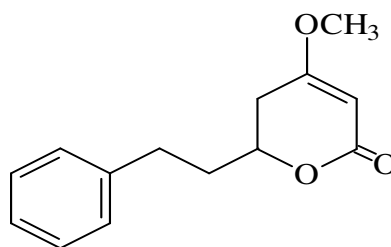
Taxol (**9**)

A kavaína (**10**) e a diidrokaína (**11**), metisticina e diidrometisticina são as kavopironas isoladas dos rizomas de *Piper methysticum* (Piperaceae), conhecida pela população nativa da Polinésia por Kava-Kava. O uso desta espécie medicinal pelas populações locais era devido aos seus efeitos calmantes e sedativos que induziam ao sono ou conferiam conforto na cabeça, sem alteração da consciência. Os polinésios utilizavam esta espécie vegetal como bebida em cerimônias rituais para desejar as boas vindas aos visitantes e auxiliar os moradores a encontrarem consenso nas decisões

potencialmente controversas que afetavam a comunidade. Atualmente, este fármaco e suas formulações são usados em casos de ansiedade, estresse e insônia<sup>7, 19, 20</sup>.

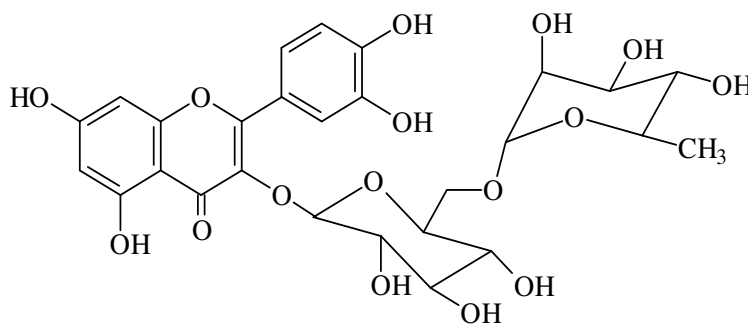


Kavaína (10)



7,8- Diidrokavaína (11)

Ressalta-se também a utilização das sementes de *Aesculus hippocastanum* (Hippocastanaceae), conhecida popularmente por castanha-da-índia e cujos primeiros relatos da literatura datam o ano de 1896, os quais demonstram o seu uso bem-sucedido no tratamento de hemorróidas. Atualmente é indicada com a mesma finalidade, bem como nos casos de eczema, flebite, tromboflebite e varizes superficiais e profundas. Esta espécie vegetal é rica em flavonóides, entre eles a rutina (12)<sup>7</sup>.



Rutina (12)

A descrição histórica da planta como recurso terapêutico eficaz para o tratamento e cura de doenças de determinado grupo étnico, traduz-se na economia de tempo e dinheiro, fatores importantes nas economias ocidentais<sup>21</sup>. Alguns valores comerciais de fármacos de origem natural são apresentados na tabela 1, abaixo.



TABELA 1 – Valores comerciais de alguns fármacos de origem natural<sup>22</sup>

<b>FÁRMACO</b>	<b>U\$</b>
Codeína	650/Kg
Morfina	1250/Kg
Ésteres fórbico	2000/g
Alcalóides da Vinca	5000/g
Taxol	1250/ampola

### 1.3 FITOTERÁPICOS

A Organização Mundial da Saúde (OMS) estabeleceu um novo conceito de saúde: a Fitoterapia, a qual é definida como sendo uma forma de terapia medicinal que emprega as plantas medicinais em seus programas de saúde dentro de um contexto científico. O termo planta medicinal foi definido como aquele que administrado ao homem ou animais, por qualquer via ou sob qualquer forma, exerce alguma espécie de ação farmacológica. Baseado na definição anterior e, considerando a finalidade da sua utilização e a forma de uso das plantas medicinais, estas podem ser classificadas como aquelas destinadas:

- a) a obtenção de substâncias puras;
- b) a produção de fitoterápicos e fitofármacos;
- c) a utilização na medicina caseira<sup>22</sup>.

Diante desta premissa, nos deparamos com um mercado crescente dos produtos fitoterápicos e com todos os controles que visem: segurança, eficácia e qualidade dos mesmos<sup>23</sup>.

No Brasil, a falta de padronização e a má qualidade do material vegetal e extratos vegetais produzidos constituem um sério problema, pois dificulta a sua comercialização em nosso próprio mercado interno, ou mais grave, impossibilita a sua exportação, devido à falta de *status* de medicamento ético, que lhe garanta eficácia, segurança e qualidade, padrões estes mensurados em bases científicas para segurança do usuário<sup>21, 24, 25,26</sup>.

A variabilidade qualitativa e quantitativa dos constituintes químicos presentes na espécie vegetal contribuem decisivamente para a má qualidade das preparações

medicinais e dos extratos vegetais brasileiros, a qual está relacionada aos seguintes critérios:

- a) Habitat: clima, altitude, latitude, temperatura, umidade, tipo de solo, condições de crescimento, aspectos fitossanitários<sup>21,27</sup>;
- b) Coleta: época, horário, condições de coleta e órgão vegetal coletado;
- c) Estabilização: secagem e armazenamento do material vegetal<sup>21,27</sup>;
- d) Confusões no reconhecimento vegetal: diversas plantas medicinais possuem o mesmo nome popular ou então, uma mesma espécie vegetal apresenta diversos nomes populares. Este fato pode gerar confusões e adulterações intencionais ou não na comercialização do material vegetal, assim sendo, variações na composição química do material vegetal<sup>27</sup>. Além disso, adulterações com plantas desconhecidas podem gerar sérios problemas, principalmente em termos dos riscos toxicológicos<sup>28</sup>;
- e) Preparação dos extratos: a polaridade do solvente, modo de extração e a instabilidade dos constituintes químicos podem influenciar na qualidade dos extratos vegetais<sup>16, 26</sup>.

No Brasil, a Agência Nacional da Vigilância Sanitária (ANVISA) através da Resolução RDC nº 48, de 16 de março de 2004, estabelece novas regras na produção de fitoterápicos, visando à padronização do marcador químico-biológico.

Esta padronização será uma referência no controle de qualidade da matéria-prima vegetal e dos próprios medicamentos. Portanto, a base principal desta legislação é a garantia da qualidade do medicamento para o consumidor, isto é, a reprodutibilidade dos fitoterápicos fabricados. Isso significa que todos os lotes desses medicamentos deverão ser produzidos com a mesma quantidade de um conjunto de moléculas denominado marcador<sup>29,30</sup>.

Neste contexto, o químico de produto natural não pode estar envolvido apenas no isolamento e identificação dos constituintes químicos, mas também desenvolvendo pesquisas na tentativa de validação de métodos analíticos modernos visando o controle de qualidade destas plantas<sup>31</sup>.

#### 1.4 O POTENCIAL DA BIODIVERSIDADE BRASILEIRA X MERCADO DE FITOTERÁPICOS

As florestas tropicais são consideradas freqüentemente como o mais promissor habitat para a descoberta de novos medicamentos devido à alta biodiversidade e o endemismo. Estima-se que existam cerca de 250 mil espécies de plantas superiores no globo terrestre e que mais da metade destas está concentrada nestas florestas<sup>7, 16, 22, 24</sup>.

Diante desta realidade, nos deparamos com o interesse cada vez maior da indústria farmacêutica mundial pelo potencial medicamentoso das florestas tropicais brasileiras. Visto sermos detentores de uma exuberante flora, riquíssima em espécies vegetais, as quais são constituídas por moléculas bioativas<sup>31</sup>.

Muitos pesquisadores têm combinado o número de espécies vegetais nativas nas florestas, com a abordagem etnobotânica para aumentar ao máximo a chance da descoberta de um fármaco bem sucedido<sup>8,22</sup>. Em virtude dos elevados custos de produção de um novo medicamento girar entre 300 a 500 milhões de dólares e o tempo gasto em pesquisas ser de 10 a 15 anos, o preço final dos fármacos para o consumidor é geralmente elevado. No entanto, o investimento para o desenvolvimento de um novo fitoterápico é muito menor e também é menor o tempo gasto em pesquisas<sup>32</sup>. Neste contexto, produtos naturais de origem vegetal constituem uma estratégia para a inovação farmacêutica e competitividade do setor, tendo em vista a singularidade estrutural dessas substâncias e patenteabilidade<sup>29,30</sup>.

Segundo dados da OMS, aproximadamente 80 % da população nos países em desenvolvimento no mundo, não tem acesso a um atendimento básico de saúde e recorre à medicina tradicional, especialmente às plantas medicinais, para tratar suas patologias. Isto significa que aproximadamente 3,5 a 4 bilhões de pessoas confiam nas plantas como fonte de medicamentos<sup>6,7,22</sup>. Estima-se ainda, que aproximadamente 50 milhões de brasileiros não têm acesso aos medicamentos, devido aos preços abusivos cobrados dos mesmos<sup>33</sup>.

O Brasil tem uma vantagem competitiva inigualável em relação a outros países: a riqueza de sua biodiversidade, a qual detém um tesouro em variedades de espécies

vegetais e animais em seus ecossistemas. Estima-se que o valor patrimonial da biodiversidade brasileira seja de aproximadamente alguns trilhões de dólares<sup>30,31</sup>.

Ao compararmos o número de espécies endêmicas por país/região é possível perceber melhor essas diferenças e entender por que os trópicos são os focos de perspectivas de descoberta de novos fármacos, conforme pode ser observado na Tabela 2<sup>34</sup>.

TABELA 2 – Número de espécies vegetais endêmicas por país/região<sup>34</sup>

PAÍS/ REGIÃO	Nº DE ESPÉCIES VEGETAIS ENDÊMICAS
Suíça	1
Alemanha	16
Reino Unido	73
México	3.376
Região Amazônica	25.000 – 30.000

Apenas 5 a 15 % da flora mundial tem sido investigada quimicamente para o isolamento de princípios ativos e uma percentagem menor ainda tem sido avaliada farmacologicamente<sup>11, 14</sup>. No Brasil, esse percentual é muito menor<sup>24</sup>.

A flora brasileira constitui-se em uma fonte em potencial de moléculas bioativas, patrimônio químico quase inexplorado, passivos de serem manufaturados pela indústria farmacêutica ou, alternativamente, fornecer protótipos moleculares para o desenho de moléculas inéditas a serem obtidas por síntese total ou modificação estrutural, e tornarem-se promissores medicamentos capazes de curar patologias ainda sem tratamento adequado<sup>24</sup>.

É importante ressaltar que a fitoterapia vem crescendo notadamente nestes últimos anos, a ponto que atualmente o mercado mundial de fitoterápicos gira em torno de aproximadamente 22 bilhões de dólares por ano e vem seduzindo a cada ano mais adeptos nos países desenvolvidos<sup>22</sup>. As taxas de crescimento anual deste mercado atingem entre 10 a 20 % na maior parte dos países. Nos Estados Unidos, o crescimento é de 20 % e o setor fatura US\$ 6,6 bilhões e na Europa US\$ 8,5 bilhões<sup>30,31,34</sup>.

Na Europa, o mercado global de fitoterápicos representa aproximadamente metade das vendas registradas no mundo. Os países com maior tradição no uso destes medicamentos são a Alemanha e depois a França<sup>35</sup>. Os fatores que contribuem

decisivamente para que a Alemanha lidere o mercado de medicamentos fitoterápicos na Europa e no mundo, são:

- a) a forte tradição médica na prescrição destes medicamentos aos seus pacientes;
- b) a existência de uma comissão independente de especialistas ligados à Agência Federal de Saúde da Alemanha: a Comissão E, a qual tem investigado sobre os fitoterápicos e as plantas medicinais. Os resultados destas pesquisas foram publicados oficialmente em 342 monografias, as quais relatam as descrições sobre as plantas medicinais e os fitoterápicos, contendo suas propriedades farmacológicas, indicações e contra-indicações, efeitos adversos, interações com outros fármacos, dose, condições de qualidade e especificações sobre as condições ótimas de armazenamento<sup>35</sup>. Estes medicamentos estão incluídos nos sistemas de reembolsos dos seguros de saúde. Na Alemanha e na França, aproximadamente 40% dos fitoterápicos são ressarcidos<sup>35</sup>.

Não há dados estatísticos precisos sobre o mercado brasileiro de fitoterápicos, mas ele é pequeno, deve movimentar recursos da ordem de 500 milhões de dólares por ano, isto é, 7 % do mercado de medicamentos do país. Projeções deste mercado apontam que ele movimentará aproximadamente 989 milhões de dólares para o ano de 2010, tendo em média um crescimento de 7 a 8 % ao ano, conforme é observado na figura 1<sup>36</sup>.



FIGURA 1 - Previsão da expansão do mercado brasileiro de fitoterápico para o ano 2010<sup>36</sup>

Nota-se que o Brasil não tem uma atuação destacada no mercado mundial de fitoterápicos, ficando inclusive atrás de países menos desenvolvidos tecnologicamente. Daí o interesse cada vez maior que a indústria farmacêutica de todo o mundo tem demonstrado por esse segmento.

## 1.5 ESTRATÉGIAS PARA A OBTENÇÃO DE MOLÉCULAS BIOATIVAS DE PLANTAS MEDICINAIS

A figura 2 demonstra algumas etapas básicas que podem ser seguidas quando se procura obter princípios ativos de plantas<sup>16</sup>. As etapas serão discutidas a seguir.

### 1.5.1 Seleção da Espécie Vegetal

A coleta de plantas para a obtenção de novos fármacos pode ser realizada através dos métodos:

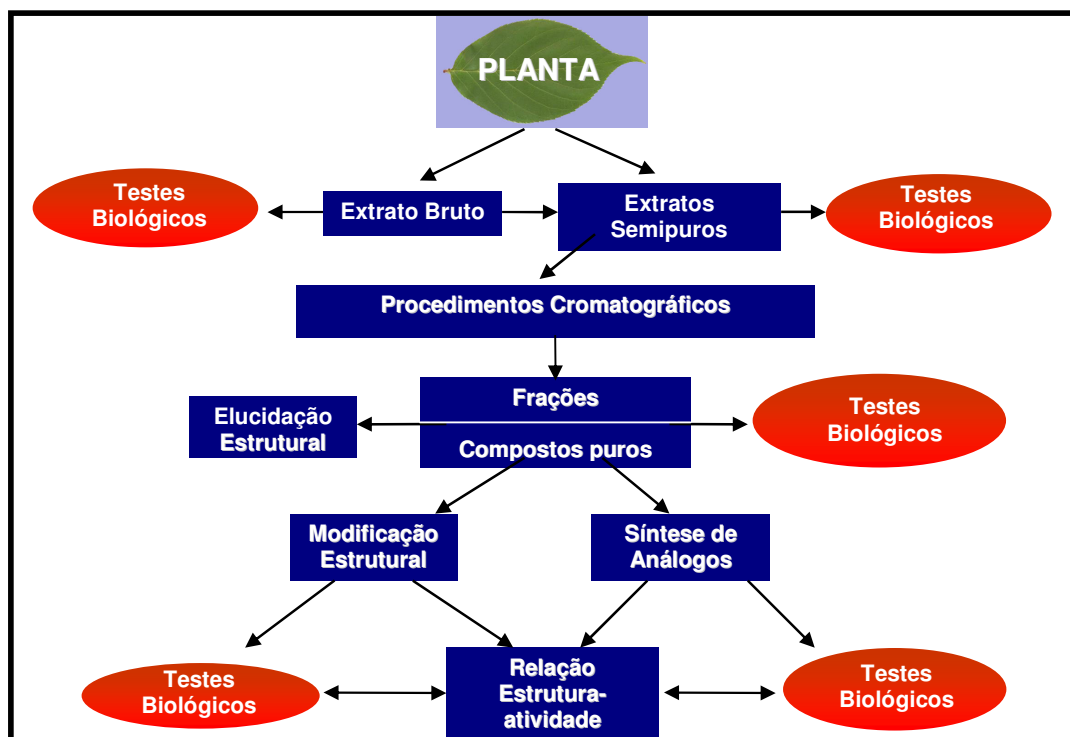


FIGURA 2 - Procedimentos gerais para a obtenção de compostos biologicamente ativos<sup>16</sup>

- a) Uso tradicional – abordagem conhecida como etnobotânica ou etnofarmacológica, a seleção da espécie vegetal ocorre através da cuidadosa observação do uso da planta medicinal em diferentes grupos étnicos, após diversas gerações<sup>10,13</sup>;
- b) Quimiotaxonômica ou filogenética – a seleção do material vegetal partindo-se da hipótese que correlaciona gêneros ou famílias botânicas para a produção frequente de constituintes químicos similares<sup>10,13</sup>;
- c) Toxicidade – o uso de plantas tóxicas, como um instrumento na pesquisa biológica, para obtenção de fármacos potentes e altamente específicos. A observação das plantas no meio ambiente tem levado ao isolamento de compostos ativos e principalmente fármacos contra bactérias e contra insetos<sup>13</sup>;
- d) Randômica – seleciona-se a espécie vegetal de uma determinada localidade, sem nenhum critério. Posteriormente, submete-a a um teste biológico bem definido com os extratos obtidos das diversas partes da planta. Os extratos que demonstrarem maior atividade são selecionados para dar prosseguimento ao isolamento das substâncias bioativas<sup>7,10, 16</sup>;
- e) Uso de diversos critérios – é possível usar a combinação dos diversos critérios citados acima<sup>13</sup>.

## 1.5.2 Preparação do Material Vegetal

### 1.5.2.1 Local de coleta

Alguns critérios a serem observados:

- a) se a espécie escolhida é encontrada em regiões diferentes no país, torna-se importante avaliar as modificações químicas que possam ocorrer em decorrência de fatores ambientais variáveis, tais como: fertilidade do solo, umidade, radiação solar, vento, temperatura, herbivoria, poluição atmosférica e poluição do solo. Outros fatores como idade da planta e época de coleta, também poderão causar modificações nos teores dos constituintes químicos de espécies vegetais<sup>7, 21, 37</sup>;

- b) perda da bioatividade devido à variabilidade na coleta, armazenamento e preparação da matéria-prima<sup>7</sup>.

#### 1.5.2.2 Coleta

Deve constar de duas etapas<sup>21</sup>:

- a) Coleta para a identificação botânica – coleta-se amostras do material vegetal contendo ramo com folhas, flores e frutos. Posteriormente, as exsicatas são encaminhadas para um herbário para ser identificada pelo botânico sistemático, contendo uma ficha com as informações:
- local e data de coleta;
  - nome do coletor;
  - parte da planta utilizada na medicina popular e suas indicações terapêuticas;
  - anotações relativas aos aspectos da planta.

A falta de identificação científica ou uma identificação errônea anulará todo o trabalho do químico, tornando-o impublicável. Após a identificação científica, a planta é catalogada contendo o número de registro da exsicata, timbre da instituição e rótulo<sup>7,10,21</sup>;

- b) Coleta definitiva – trata-se da coleta de grande quantidade de material vegetal destinada aos estudos fitoquímicos e biológicos. Escolhe-se a parte da planta que será investigada e deve-se coletar no mínimo 2 Kg do material vegetal, para viabilizar o isolamento de grande quantidade das substâncias majoritárias, e assim, possibilitar as avaliações biológicas<sup>21</sup>.

#### 1.5.2.3 Dessecação do material vegetal

A dessecação tem por finalidade a retirada de água e, com isso, impedir reações de hidrólise e de desenvolvimento microbiano da planta medicinal. Este procedimento deve ocorrer logo após a sua coleta para evitar a degradação dos princípios ativos e assim, permitir a sua estabilização. A dessecação é freqüentemente realizada,



estendendo-se a planta em um local apropriado, por vários dias à temperatura ambiente, até a sua completa desidratação. Mas também pode ser dessecada em estufa a temperatura de 40°C e com circulação de ar<sup>10</sup>.

#### 1.5.2.4 Moagem e pesagem do material vegetal

A moagem tem por finalidade, reduzir o material vegetal a pó, preparando-o para o processo de extração. O aumento da área de contato entre o material vegetal e o solvente torna mais eficiente a extração dos constituintes químicos. Posteriormente, deve ser pesado e submetido ao processo de extração<sup>10</sup>.

#### 1.5.3 Extração

Visa à extração dos constituintes químicos do material vegetal através de um solvente extrator. Neste processo, temos que levar em consideração a capacidade de extração do solvente, pois quanto mais eficiente for o processo de extração, maior será a variedades de compostos presentes no extrato<sup>10</sup>. Na preparação dos extratos, a planta deve estar completamente fresca ou totalmente seca para definir com melhor exatidão o rendimento tanto da massa bruta como dos constituintes químicos<sup>38</sup>.

Para uma única extração, a frio ou a quente, utiliza-se geralmente um solvente polar como o metanol e o etanol<sup>10,21,37</sup>. Presumivelmente, os solventes alcoólicos rompem as membranas celulares e extraem uma maior quantidade de constituintes endocelulares<sup>31,32</sup>. Nestas circunstâncias, o metanol P.A. é o mais indicado, pois possibilita a extração de um maior número de compostos<sup>37</sup>.

A preparação de extratos pode ser feita através de:

- a) Soxhlet – extração a quente, exigindo o emprego do aparelho de Soxhlet, em que a cada ciclo da operação, o material vegetal entra em contato com o solvente renovado, possibilitando uma extração altamente eficiente. A eficiência dos processos de extrações depende em grande parte, do fenômeno da difusão. Portanto, a renovação do solvente em contato com o material vegetal tem grande

influência na velocidade de dissolução. Este procedimento extrativo utiliza uma quantidade menor de solvente, quando comparado com as quantidades necessárias para os demais processos de extração, visando a obtenção dos mesmos resultados qualitativos e quantitativos<sup>31,33</sup>;

- b) Maceração – extração a frio, consiste em colocar a planta fragmentada em contato com o solvente extrator em um recipiente fechado, a temperatura ambiente e ao abrigo da luz por um período determinado. Neste procedimento de extração não ocorre a renovação do solvente, sendo assim, não conduz ao esgotamento do material vegetal, seja devido à saturação do líquido extrator ou ao estabelecimento de um equilíbrio difusional entre o meio extrator e o interior da célula. Portanto, para que esta extração seja eficiente temos que fazer uma remaceração, isto é, repetir a operação utilizando o mesmo material, renovando-se apenas o solvente extrator<sup>38, 39, 40</sup>;
- c) Percolação – extração a frio e exaustiva das substâncias ativas presentes no material vegetal triturado, a qual é colocada em um percolador, e feito passar o solvente extrator<sup>21,31</sup>. Diferentemente da maceração, a percolação é um processo dinâmico. O extrato é obtido através da velocidade do fluxo, o qual pode ser lento, moderado e rápido<sup>38,39, 40</sup>;
- d) Extração ácido – base – baseia-se no processo de partição entre solventes aquosos ácidos ou básicos e solventes orgânicos imiscíveis com água, como: éter, clorofórmio e acetato de etila<sup>21</sup>. Como no caso dos alcalóides, os quais são convertidos na forma de sal em soluções aquosas de ácidos minerais, e quando tratado com soluções alcalinas, o nitrogênio libera um íon hidrogênio formando uma amina livre. Essas propriedades facilitam a sua extração e isolamento de outros constituintes vegetais<sup>39</sup>.

#### 1.5.4 Concentração dos extratos

Os extratos vegetais podem ser concentrados eliminando-se parcialmente ou totalmente o solvente pelos seguintes métodos<sup>40</sup>:

- a) A vácuo – utilizando-se rota-vapor e temperaturas constantes de 40°C e em ausência de oxigênio, já que se pratica o vácuo<sup>40</sup>;
- b) Liofilização – utiliza-se para solventes aquosos. Consiste em eliminar o solvente mediante uma congelação a temperaturas muito baixas, seguida de sublimação do solvente que passa diretamente do estado sólido ao estado de vapor<sup>40</sup>.

#### 1.5.5 Semipurificação do extrato bruto

O extrato bruto deve ser na seqüência fracionado, visando posteriormente o isolamento e purificação de compostos bioativos. Este processo pode ser realizado pelos seguintes métodos:

- a) Extração líquido/líquido – em um funil de separação tampado, proceder extrações sucessivas e com agitação vigorosa, utilizando-se solventes imiscíveis e de polaridades crescentes, como hexano, diclorometano, acetato de etila e butanol. Quando o extrato provém de material vegetal dessecado e pulverizado, adiciona-se 10 % de água, visando a formação de duas fases. A extração múltipla utiliza um volume pequeno de solvente e repete-se por 4 vezes. Este procedimento é mais eficiente do que somente uma única extração, utilizando-se o volume total do solvente<sup>40</sup>.
- b) Coluna de filtração – consiste em fracionar o extrato alcoólico por meio de uma coluna filtrante, usando-se sílica gel como adsorvente e solventes de polaridades crescentes, como: hexano, diclorometano, acetato de etila e butanol. Procedimento indicado para o caso de fracionamento em que ocorre a formação de emulsões persistentes<sup>38, 40, 41</sup>.

A figura 3 ilustra os procedimentos descritos e indica as prováveis classes de compostos separados<sup>37</sup>.

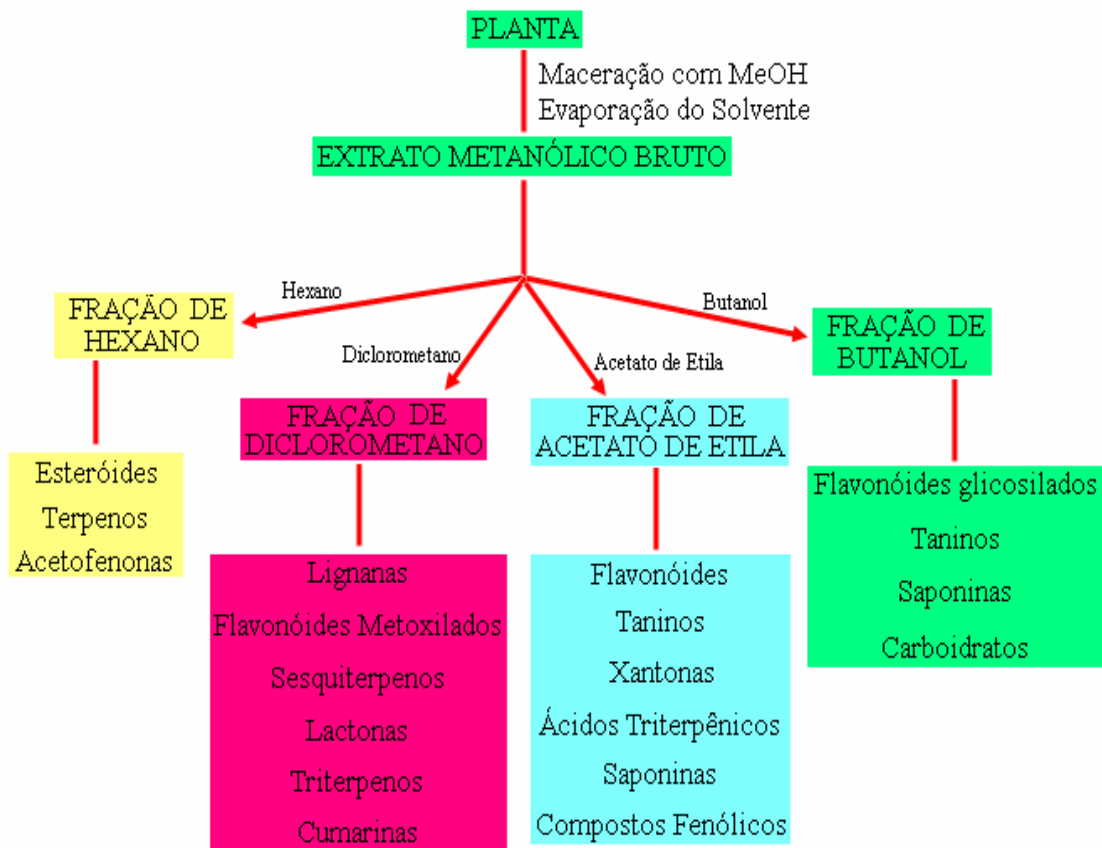


FIGURA 3 - Esquema geral de partição e separação provável dos principais metabólitos secundários presentes em plantas<sup>37</sup>.

Cada uma das frações obtidas pelos processos de separações acima descritos, posteriormente deve-se analisar por cromatografia em camada delgada, com objetivo de detectar as classes de compostos químicos presentes na espécie medicinal e submetê-las a um bioteste de pureza e avaliação de toxicidade em animais<sup>10, 41</sup>.

#### 1.5.6 Marcha sistemática analítica

Os extratos vegetais devem ser submetidos a uma investigação preliminar dos seus constituintes químicos, através de uma análise qualitativa de cromatografia em camada delgada (CCD), o qual possibilita o conhecimento prévio e indica a natureza das substâncias presentes no extrato, facilitando a escolha da técnica de fracionamento

cromatográfico. As principais classes de constituintes químicos de plantas medicinais que podem ser detectadas com a aplicação de testes analíticos padrões são: esteróides, cumarinas, fenóis (flavonóides, taninos, lignanas e neolignanas), xantinas e alcalóides, utilizando-se variados tipos de reveladores específicos<sup>21,40,41,42</sup>. Esta análise fitoquímica preliminar também se constitui em um valioso instrumento utilizado no processo de seleção de plantas para estudo científico.

#### 1.5.7 Isolamento, purificação e elucidação estrutural de compostos orgânicos

O processo de isolamento, purificação e identificação de compostos de uma mistura de um material vegetal, envolve várias etapas de separação, requerendo equipamentos especializados e principalmente habilidade. Para isto, a cromatografia tem lugar de merecido destaque no que concerne à separação, identificação e quantificação de compostos<sup>10</sup>.

Os principais métodos cromatográficos utilizados são<sup>39, 40,41,43</sup>:

- a) Cromatografia em camada delgada (CCD) – consiste na separação dos componentes de uma mistura através de uma migração diferencial sobre uma camada delgada de adsorvente retido sobre uma superfície plana<sup>37</sup>. Este método cromatográfico permite o monitoramento em processos de isolamento e purificação de compostos e assim, otimizar as pesquisas fitoquímicas;
- b) Cromatografia líquida – a fase móvel é um eluente líquido e pode ser de dois tipos<sup>37, 38</sup>:
  - Cromatografia em coluna (CC) – a fase estacionária é mantida dentro de uma coluna de vidro através do qual a fase móvel é forçada a passar devido à pressão exercida pela força da gravidade. A cromatografia em coluna é uma metodologia amplamente utilizada em pesquisas fitoquímicas visando a separação e purificação de compostos<sup>32,33,36,37</sup>;
  - Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) – método muito empregado devido a sua elevada sensibilidade, eficácia e rapidez. Consiste em se fazer passar, sob elevada pressão, a fase móvel (líquida), pela amostra previamente

introduzida no sistema de injeção do equipamento, por uma coluna compactamente empacotada com a fase estacionária, que também é um líquido retido sobre um suporte inerte. A grande diferença com a cromatografia líquida tradicional consiste no emprego de elevada pressão para impulsionar a fase móvel, o qual permite conseguir cromatogramas muito rápidos com uma elevada resolução (separação)<sup>39</sup>;

- Cromatografia por exclusão – consiste numa peneira molecular onde a fase estacionária é um gel de composição inerte, contendo poros de tamanho controlado, permitindo a movimentação de substâncias de tamanho pequeno, pois estas são capazes de penetrar facilmente em todos os poros, equilibrando-se com a fase móvel intrasticial e intersticial. As substâncias de maior tamanho são excluídas de todos os poros, passando entre os grânulos acompanhando a fase móvel intersticial (fora dos poros)<sup>37</sup>;
- Cromatografia gasosa (CG) – é uma técnica com elevada sensibilidade, a qual detecta compostos em concentrações que variam de picogramas a miligramas. Portanto, a cromatografia gasosa é uma excelente técnica para análises quantitativas de substâncias voláteis e estáveis termicamente<sup>43,44</sup>.

A utilização de métodos espectroscópicos na identificação de compostos orgânicos permitiu a redução das quantidades de material necessário para as análises e possibilitou, ao mesmo tempo, a determinação em curto espaço de tempo de estruturas complexas com vários centros estereogênicos. Os principais métodos espectroscópicos são<sup>10</sup>:

- a) Espectroscopia na região do Infravermelho (IV) – técnica que abrange no espectro eletromagnético a região de  $4000$  a  $400\text{cm}^{-1}$ , fornecendo informações sobre características da molécula como um todo, de seus grupos funcionais, que dão origem às bandas que ocorrem na mesma frequência, independente da estrutura da molécula<sup>10,16,45,46</sup>;
- b) Espectroscopia na região do ultravioleta (UV) – a absorção molecular na região do ultravioleta e do visível do espectro depende da estrutura eletrônica da molécula. A absorção de energia é quantizada e conduz à passagem dos elétrons de orbitais de

maior energia em um estado excitado. A espectroscopia no ultravioleta é limitada aos compostos que possuem sistemas conjugados de insaturações ou grupos cromóforos<sup>45,46</sup>;

- c) Espectroscopia de ressonância nuclear de hidrogênio (RMN  $^1\text{H}$ ) e de carbono-13 (RMN  $^{13}\text{C}$ ) – o RMN  $^1\text{H}$  fornece o deslocamento químico dos vários tipos de hidrogênio presentes na molécula; já o RMN  $^{13}\text{C}$  fornece informações sobre os carbonos existentes. No caso de uma molécula complexa, ou que não tenha dados na literatura, faz-se necessário o uso de técnicas suplementares que possam fornecer maiores detalhes sobre a estrutura e mesmo comprová-la mediante diversos tipos de correlações<sup>16,45,46</sup>;
- d) Espectrometria de massas (EM) – fornece dados sobre o peso molecular e a fórmula e possibilita ainda, a identificação de fragmentos característicos da molécula, utilizando-se bombardeamento de elétrons com energia suficiente para fragmentar a molécula<sup>10, 16, 46</sup>.

#### 1.5.8 Modificação Estrutural e Correlação Entre Estrutura Química e Atividade Biológica

A pesquisa farmacêutica mais promissora em termos de inovação, em países industrializados, está intimamente ligada ao planejamento racional de fármacos. Por outro lado, em países como o Brasil o estágio ainda é inferior. Particularmente em nosso caso, a busca de novos fármacos oriundos de produtos naturais não pode ser deixada de lado. Conseqüentemente, a síntese de moléculas oriundas de produtos naturais e/ ou sua modificação estrutural devem ser, portanto, enfatizadas<sup>37</sup>.

Sendo assim, uma vez obtido um composto biologicamente ativo, podemos lançar mão de estudos envolvendo modificação molecular, com o objetivo de otimizar essa atividade. Muitas mudanças podem ser introduzidas numa molécula, dependendo dos seus grupos reativos. Inicialmente, realizam-se modificações procurando introduzir grupos que conferem ao composto em estudo maior ou menor hidrofobicidade ou grupos doadores e/ou receptores de elétrons, permitindo

posteriormente a aplicação de algum método de correlação entre a estrutura química e a atividade biológica. Neste contexto, foram desenvolvidos vários métodos de correlação estrutura-atividade, objetivando promover um planejamento racional de novas moléculas ativas. A aplicação destes métodos auxilia na predição de qual grupo novo ou átomo pode ser introduzido em determinada molécula para torná-la mais ativa, proporcionando assim muitas vantagens aos químicos e farmacólogos<sup>37</sup>.



## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 POSIÇÃO SISTEMÁTICA DA *PIPER SOLMSIANUM* C. DC. VAR. *SOLMSIANUM*

Segundo o sistema de classificação de CRONQUIST (1981)<sup>47</sup>, a espécie *Piper solmsianum* DC variedade *solmsianum* tem a seguinte classificação:

REINO: Plantae

DIVISÃO: Magnoliophyta

CLASSE: Magnoliopsida

SUBCLASSE: Magnoliidae

ORDEM: Piperales

FAMÍLIA: Piperaceae

GÊNERO: *Piper*

ESPÉCIE: *solmsianum* C. DC. variedade *solmsianum*

### 2.2 SINOPSE DA FAMÍLIA PIPERACEAE

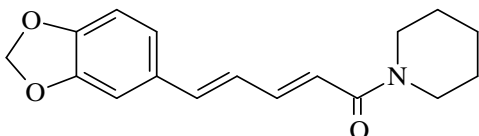
A família Piperaceae é classificada entre as mais primitivas famílias entre as angiospermas, é constituída de 10 a 12 gêneros e um grande e incerto número de espécies, estimado em 1400 a 2000 que habitam lugares úmidos e sombrios das regiões tropicais<sup>47,48</sup>. No Brasil, a família é representada por 5 gêneros: *Piper* L., *Peperomia* Ruiz & Pav, *Pothomorphe* Miq., *Ottonia* Spreng.e *Sarcorrhachis* Trel..

Destacamos os gêneros *Piper* e *Peperomia*, por serem os mais representativos na flora brasileira, perfazendo um total de 460 espécies<sup>49,50,51</sup>.

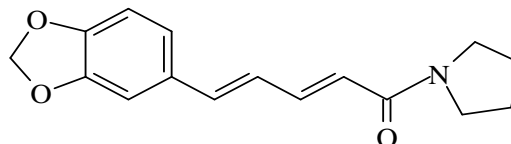
As Piperaceae possuem importância econômica, ecológica e medicinal, sendo que muitas espécies têm sido utilizadas na alimentação e na medicina popular para o tratamento de muitas patologias, como do trato respiratório (asma, bronquite e tosse), do aparelho digestivo (dores abdominais, diarreias, digestiva, carminativa),

antiinflamatório (reumatismo), antimicrobiana (antibacteriana, antifúngica, tratamento de feridas), antileucêmica, vaginites, antihelmíntica e doenças venéreas<sup>52</sup>. Em virtude a estas inúmeras indicações terapêuticas, as Piperaceae se constituem uma estimulante fonte para a pesquisa fitoquímica e biológica<sup>53,54</sup>.

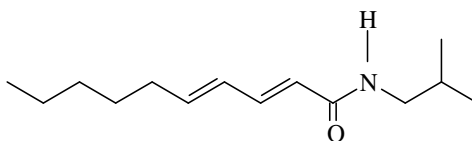
As propriedades organolépticas especiais das Piperaceae são atribuídas a pimenta preta, que são preparadas dos frutos dessecados de *Piper nigrum*, os quais tornaram-se um condimento universal no mundo moderno. O sabor característico da pimenta preta é produzido por um conjunto de compostos, entre eles as amidas piperina e piperlina são responsáveis pelo gosto penetrante do condimento enquanto a pellitorina contribui significativamente para o seu aroma.<sup>51,52</sup>.



Piperina (12)



Piperlina (13)



Pellitorina (14)

As Piperaceae são plantas eretas ou escandentes, subarbustos, arbustos ou pequenas árvores, terrestres ou epífitas. Folhas estipuladas, alternas, opostas ou verticiladas, sésseis ou pecioladas, inteiras, de consistência e formas as mais diversas, tricomas muito variados, geralmente dotadas de glândulas translúcidas. Flores aclamídeas, diminutas, monoclinas ou díclinas, protegidas por bracteólas pediceladas ou sésseis, peltadas, dispostas esparsas ou congestas em espigas, formando umbelas ou não, ou dispostas em racemos, axilares ou terminais, opostas ou não às folhas. Estames 2-6, livres ou adnatos às paredes do ovário; antenas rimosas, bitecas ou unitecas. Ovário súpero, séssil, geralmente imerso na raque, ou pedicelado, unilocular,

uniovulado; óvulo basal: estilete presente ou ausente, 1- 4 estigmas variáveis na forma. Fruto drupa, séssil ou pedicelado. Endosperma escasso <sup>55</sup>.

### 2.3 CONSIDERAÇÕES GERAIS DO GÊNERO *PIPER*

O gênero *Piper* é constituído por aproximadamente 700 espécies, as quais encontram-se distribuídas em regiões tropicais e subtropicais, onde a população nativa tem usado algumas destas plantas como condimento, agentes no controle de pestes e no tratamento de muitas doenças<sup>56,57,58</sup>. Estas espécies vegetais apresentam elevados valores comerciais, econômicos e grande importância medicinal.

Em geral, são sub-arbustos, arbustos ou arvoretas com 1 a 5 metros, podendo atingir até 10 metros de altura. Os caules são mais ou menos lignificados, nodosos e ramosos. As folhas apresentam pecíolo longo e são alternas ao caule. O limbo é simples e a sua margem é inteira, apresentam diferentes formas e de tamanho variável, podendo atingir em algumas espécies até 40 cm de comprimento, consistência membranácea a coriácea. As flores são sésseis, aperiântadas, dispostas em espigas opostas às folhas que variam de comprimento e espessura, eretas, subcurvas ou curvas, providas de pedúnculos delgados ou espessos. 2 a 5 estames e 3 a 4 estigmas, filiformes, curvos, estilosos ou sésseis. Ovário ovóide ou subovóide. Os frutos são drupas globosas com pericarpo pouco espessado<sup>54,55,59</sup>.

Os principais agentes polinizadores das sementes de Piperaceae são os morcegos da família Phyllostomidae, em particular *Carollia perspicillata*, os quais demonstram uma distinta preferência pelos frutos de *Piper*. O morcego é atraído pelos frutos maduros, alimentando-se dos mesmos e eliminando em seguida as sementes através de seus excrementos<sup>60</sup>.

### 2.4 DESCRIÇÃO BOTÂNICA DA ESPÉCIE EM ESTUDO

A *Piper solmsianum* C. DC. var. *solmsianum*, é um arbusto glabro que mede 1 a 3 metros de altura, com ramos estriados, glabros, entrenós 3-14 cm de

comprimento<sup>54,59</sup>. As folhas apresentam formato oval – arredondada, ápice acuminado, cordada na base, medindo 5,5 - 20 cm de largura e 8 - 23 cm de comprimento, glabras, nervuras secundárias penatiforme, salientes na face dorsal (epiderme inferior) em número de 4 de cada lado, as quais se entrecruzam e se anastomosam (formando um rede), pecíolo com 2,5 - 6,5 cm de comprimento, glabro. Inflorescência em espiga solitária, com 5 mm de diâmetro e 6-15 cm de comprimento, pedúnculo com 1-1,5 cm de comprimento; com 3 estames. Os frutos são drupas, com formato inversamente piramidal – triangular e glabro. Estigmas sésseis. Floresce nos meses de setembro, outubro, novembro e em dezembro<sup>54,59,61</sup>. Encontra-se em frutificação nos meses de abril, junho e dezembro. É conhecida popularmente por caapeba ou pariparoba<sup>59</sup>.

Sinonímias: *Piper leucanthum* C. DC. e *Piper santosanum* C.DC.<sup>54,58,59</sup>.

Localização: espécie com distribuição geográfica no sudeste e sul do Brasil. É uma espécie freqüente na mata com luz difusa, em planícies alagadiças, semi-paludosas ou brejos, não raro ocorrendo em capoeiras ou matas de encostas e restingas<sup>54,58,61</sup>.



FIGURA 4 - Inflorescência em espiga da *Piper solmsianum* C.DC. var. *solmsianum*.



FIGURA 5 - Aspecto do ramo da *Piper solmsianum* C.DC. variedade *solmsianum*.

## 2.5 ESTUDOS FITOQUÍMICOS ANTERIORES DO GÊNERO *PIPER*

Uma ampla revisão cobrindo o período de 1907 a 1996 sobre metabólitos secundários de espécies do gênero *Piper* listou aproximadamente seis centenas de constituintes químicos pertencentes a diferentes classes de compostos bioativos, tais como: alcalóides, amidas, chalconas, diidrochalconas, flavonas, flavanonas, terpenos, esteróides, kavapironas, fenilpropanóides, lignanas e neoliganas<sup>51</sup>.

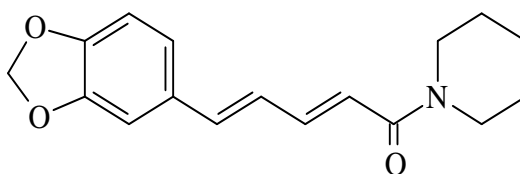
A seguir, serão relacionadas algumas classes de compostos químicos já isolados e fisiologicamente ativos.

### 2.5.1 Alcalóides e Amidas

Espécies de *Piper* tem sido amplamente investigada quimicamente em todo o mundo resultando no isolamento de 592 compostos diferentes, dos quais 145 são alcalóides e amidas<sup>51</sup>.

As amidas são metabólitos que resultam da rota biossintética do ácido chiquímico, são compostos nitrogenados, derivados da amônia (NH<sub>3</sub>), pela substituição de um ou mais átomos de hidrogênio por igual número de radicais monoacilas<sup>62</sup>.

Classificam-se as amidas do gênero *Piper* nos seguintes grupos: pirrolidínicos, piperidínicos, isobutílicos, isopentenílicos, n-pentenílicos, isododecenílicos, piridino, pirrol e outros<sup>52</sup>. A piperina (**12**) foi a primeira amida isolada de espécies de *Piper*. Ela é encontrada em: *P. acutisleginum*, *P. album*, *P. argyrophylum*, *P. attenuatum*, *P. aurantiacum*, *P. betle*, *P. callosum*, *P. chaba*, *P. cubeba*, *P. guineense*, *P. hancei*, *P. khasiana*, *P. longum*, *P. macropodum*, *P. nepalense*, *P. nigrum*, *P. novae hollandiae*, *P. peepuloides*, *P. retrofractum*, *P. pylvaticum*<sup>51</sup>.



Piperina (**12**)

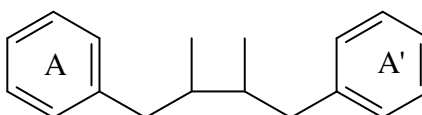
Nas Piperaceae, encontram-se alcalóides piperidínicos, pirrolizidínicos, piridínicos, isoquinolínicos e mistos. No gênero *Piper*, os alcalóides piperidínicos são os de ocorrência mais comum, tendo sido isolados de espécies tais como: *P. longum*, *P. nigrum*, *P. chaba*, *P. retrofractum* e *P. officinarum*<sup>51</sup>.

Os alcalóides são substâncias orgânicas de natureza básica, possuem sempre um nitrogênio que forma parte de um heterocíclico e biogeneticamente procedem de aminoácidos<sup>62</sup>.

Os alcalóides piridínicos têm recebido especial atenção, principalmente por suas atividades citotóxicas<sup>52</sup>.

### 2.5.2 Lignanas e Neolignanas

O termo lignana foi introduzido por Haworth, na década de 1940, para denominar uma classe de compostos químicos vegetais provenientes da rota biossintética do ácido chiquímico, os quais são formados através do acoplamento oxidativo de unidades *p*-hidroxifenilpropanos, como os álcoois cinamílicos entre si ou destes com ácidos cinâmicos. Também pode ocorrer com os monômeros, álcool coniferílico ou álcool sinapílico, formando compostos dímeros. Representam um grupo de compostos opticamente ativos, os quais apresentam duas unidades de C<sub>6</sub> e C<sub>3</sub> ligados pelos carbonos β e β' da cadeia lateral (**13**)<sup>39, 63, 64</sup>.



Estrutura básica das lignanas (**13**)

O termo neolignana foi introduzido por Gottlieb, em 1978, para designar dímeros de fenilpropanóides, nos quais as unidades C<sub>6</sub> e C<sub>3</sub> estão ligadas por outras posições que não as β - β'. As neolignanas são formadas pelo acoplamento oxidativo de 1-propenilfenol ou alilfenol, e não apresentam o carbono γ oxigenado<sup>63, 64</sup>. As lignanas e neolignanas foram classificadas nos seguintes grupos, conforme é demonstrado na figura 6 e nas tabelas 3 e 4 abaixo<sup>65</sup>.

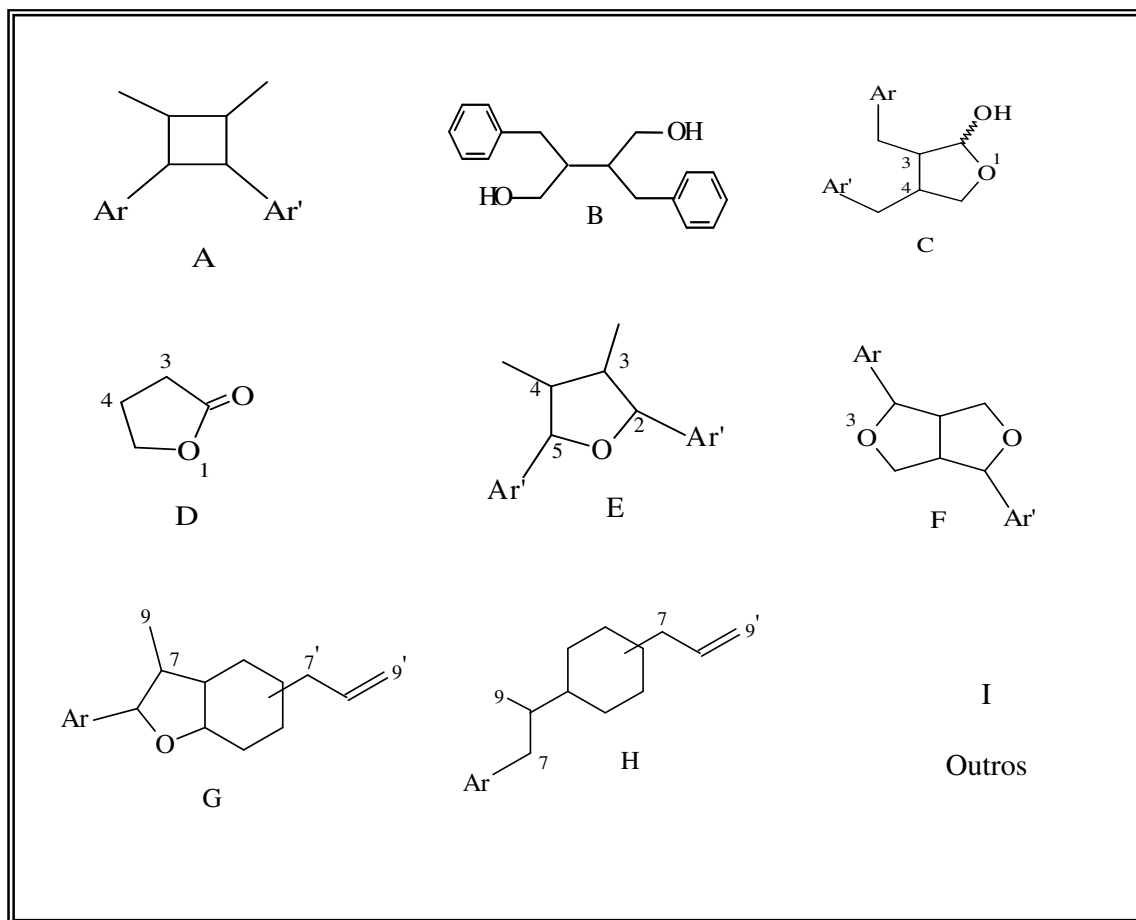


FIGURA 6 - Esqueletos de lignanas e neolignanas segundo classificação de Jensen *et al.* (1993)<sup>65</sup>

TABELA 3 – Classificação das lignanas e neolignanas em grupos <sup>65</sup>

GRUPOS	CLASSIFICAÇÃO
A	1,4 – diaril-2,3-dimetilciclobutano
B	2,3-dibenzilbutano-1,4-diol
C	3,4-dibenzil-γ-butirolactol
D	γ - butirolactonas
E	2,5-bisaril-3,4-dimetil tetrahidrofurano
F	2,6-bisaril-3,7-dioxa [3,3,0]biciclooctano
G	Benzofuranos
H	1,2-diarilpropano
I	Outros



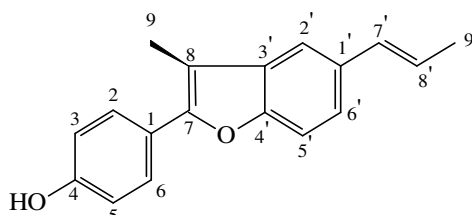
TABELA 4 – Grupos de lignanas e neolignanas e plantas relacionadas, segundo Parmar (1997)<sup>51</sup>

GRUPOS DE LIGNANAS	PLANTAS	GRUPOS DE NEOLIGNANAS	PLANTAS
B, C, D, E e F	<i>P. arborescens</i>	A, G, H e E	<i>P. attenuatum</i>
	<i>P. branchistachyum</i>		<i>P. capense</i>
	<i>P. clusii</i>		<i>P. clarkii</i>
	<i>P. cubeba</i>		<i>P. cubeba</i>
	<i>P. guineense</i>		<i>P. futokadzura</i>
	<i>P. lacunosum</i>		<i>P. hancei</i>
	<i>P. lowong</i>		<i>P. interruptum</i>
	<i>P. nigrum</i>		<i>P. polysphorum</i>
	<i>P. peepuloides</i>		<i>P. schimdtii</i>
	<i>P. retrofractum</i>		<i>P. sumatranum</i>
	<i>P. ribesoides</i>		<i>P. thomsonii</i>
	<i>P. sumatranum</i>		<i>P. wallichii</i>
	<i>P. sylvaticum</i>		
	<i>P. trichostachyum</i>		

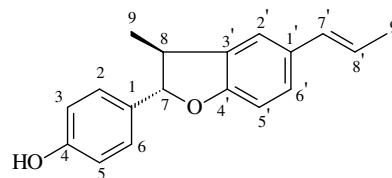
Segundo PARMAR, *et al.* (1997)<sup>51</sup> em seu trabalho de revisão química do gênero *Piper*, verificou que já foram isoladas 47 lignanas e 70 neolignanas.

MOREIRA *et al.*(1995)<sup>54</sup> submeteu a investigação fitoquímica os caules e folhas da espécie vegetal *Piper solmsianum* C.DC. que foram coletados no município de Teresópolis-RJ. No presente trabalho, foi possível isolar e identificar no extrato hexânico das folhas, a neolignana Eupomatenóide-6 (**14**).

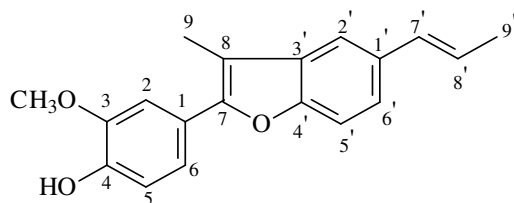
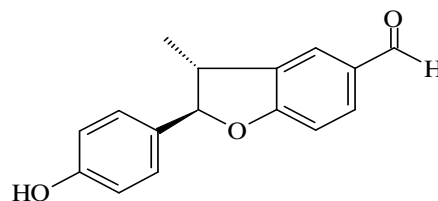
A literatura nos revelou, que as folhas de *Piper decurrens* foi alvo de uma investigação fitoquímica e biológica em (1996), sendo que a pesquisa química permitiu o isolamento de 4 neolignanas por métodos cromatográficos, as quais foram identificadas por técnicas espectroscópicas, como sendo: eupomatenóide-6 (**14**), conocarpano (**15**), eupomatenóide-5 (**16**), e decurenal (**17**)<sup>66</sup>.



Eupomatenóide-6 (**14**)

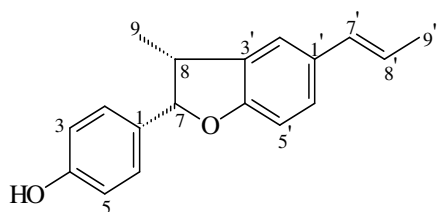
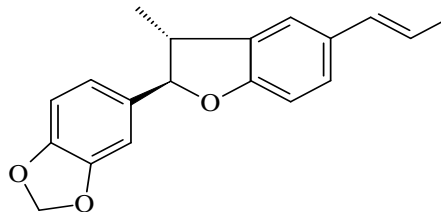


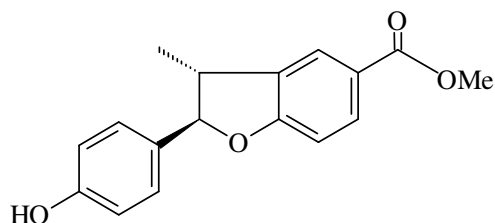
Conocarpano (**15**)<sup>57, 67</sup>

Eupomatenóide-5 (**16**)<sup>57</sup>Decurenal (**17**)<sup>53</sup>

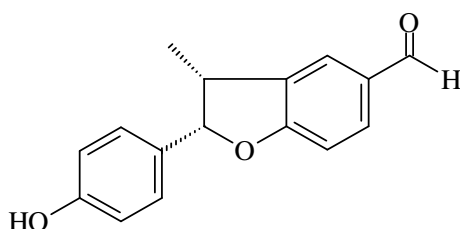
Pesquisas anteriores realizadas com as partes aéreas de *Piper chaba* demonstraram o isolamento das amidas piperina e silvatina, do esteróide  $\beta$ -sitosterol e dos alcalóides piperlonguminina e piplartina. A equipe de pesquisadores BHANDARI, *et. al.* (1997) isolaram do extrato etanólico bruto dos caules da *Piper chaba* a (8R,8'R)-9-hidroxi,3,4-dimetoxi,3',4'-metilenodioxi-9-9'epoxi lignana<sup>68</sup>.

BENEVIDES, SARTORELLI, KATO (1999)<sup>53</sup> isolaram por meio de técnicas cromatográficas do extrato acetato de etila das raízes de *Piper regnellii* 13 compostos. Após a análise espectroscópica destes constituintes, foi possível identificar quatro neolignanas derivadas do diidrobenezofurano, como sendo: (7S, 8R) - 4 - hidroxí - 4',7 - epóxi - 8,3' - neolignana-7'[E] - eno, estabelecido como C-7 epímero do conocarpano (**18**), (7S, 8R) - 3, 4 - metilenodioxi - 4',7 - epóxi-8,3' - neolignana-7'[E] - eno, a qual foi denominada de regnelline (**19**), metil (7R, 8R) - 4 - hidroxí - 8',9' - *dinor* - 4',7' - epóxi - 8',3' - neolignana-7' - éster (**20**), (7S, 8R) - 4 - hidroxí - 8',9' - *dinor* - 4',7' - epóxi - 8,3' - neolignana-7' - aldeído estabelecido como C-7 epímero do deccurenal (**21**)<sup>53</sup>.

C-7 *epi* Conocarpano (**18**)Regnelline (**19**)



Metil (7R, 8R)-4-hidroxi-8',9'-*dinor*-4',7'-epoxi-8,3'-neolignana-7'-éster (**20**)



C-7 *epi* decurenal (**21**)

Prosseguindo os estudos com lignanas/neolignanas, SARTORELLI, *et. al.* (2001), demonstraram o caminho biossintético para a formação da neolignana diidrobenzofurânica (+)-conocarpano nas folhas de *Piper regnellii*, por meio de administração *in vivo* do precursor L-fenilalanina [U-<sup>14</sup>C] e por conversão enantioseletiva de *p* - hidroxipropenilbenzeno para (+)- conocarpano (85 % de excesso enantiomérico – ee) obtida de suas folhas. A preparação da enzima conocarpano sintase foi destituída da atividade peroxidase geral e demonstrado a especificidade do substrato em relação *p* -hidroxipropenilbenzeno já que o ácido *p* – cumárico, álcool *p* - cumaril e *E* – isoeugenol, não foram convertidos para nenhum dímero, ocorrendo como produto natural na planta intacta<sup>64</sup>.

A rota biossintética está apresentada na figura 7.

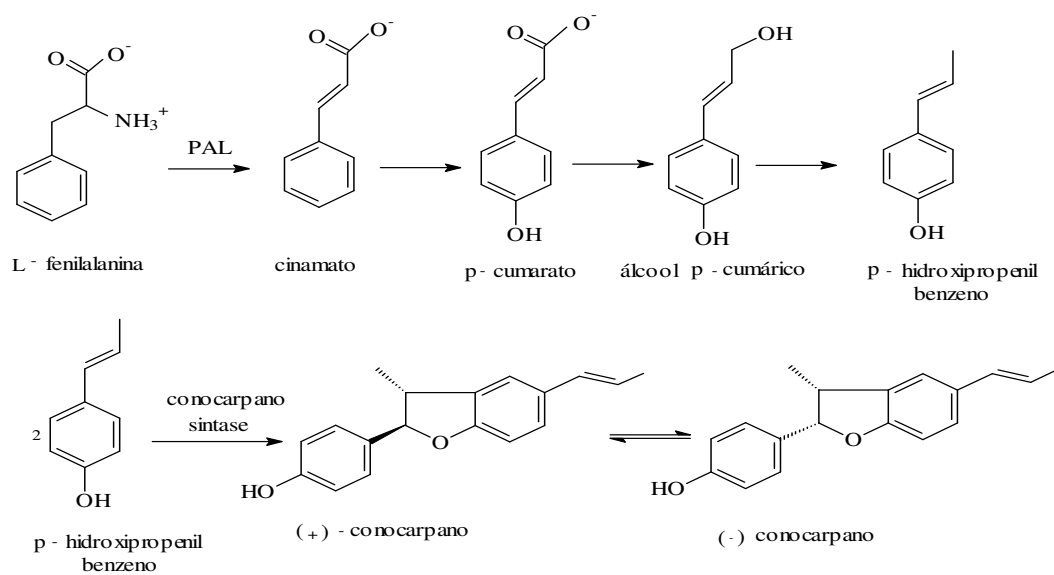
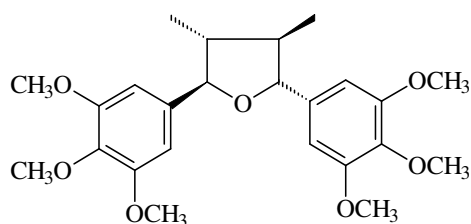
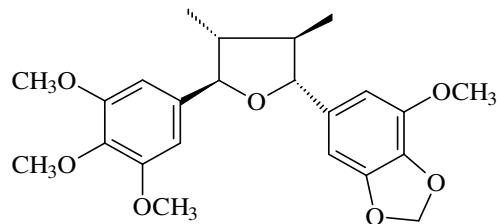


FIGURA 7 - Biossíntese de (+) – conocarpone em *Piper regnellii* <sup>64, 69</sup>

A espécie medicinal *Piper solmsianum* C. DC., foi novamente estudada no aspecto químico por MARTINS, *et al.* (2000)<sup>53</sup> e nesta investigação fitoquímica, isolaram do extrato acetato de etila das folhas e dos caules coletados no mês de junho na cidade de São Paulo/SP, cinco fenilpropanóides, bem como, a tetrahydrofurano lignana tetrahydrofurânica denominada de (-)-Grandisina (**22**) e (7R,8R,7'S,8'R)-3',4'-metilenodioxi-3,4,5,5'-tetrametoxi-7,7'-epoxilignana (**23**)<sup>56, 70</sup>.



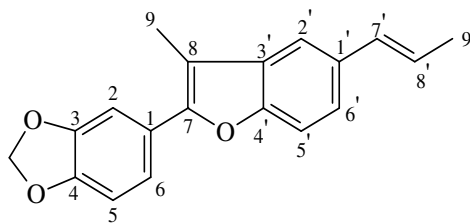
(-)-Grandisina (**22**)



(7R,8R,7'S,8'R)-3',4'-metilenodioxi-3,4,5,5'-tetrametoxi-7,7'-epoxilignana (**23**)

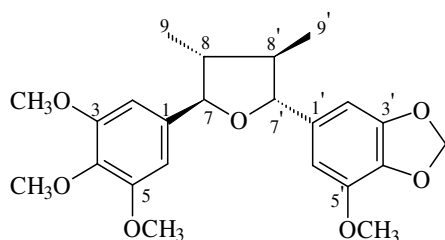
Os constituintes químicos de *Piper fulvescens* foram isolados e identificados por VEGA *et al.* (2001) como sendo: esteróides, arilpropanóides, sesquiterpenos e as

neolignanas eupomatenóide-3 (**24**), eupomatenóide-5 (**16**, ver p.32), eupomatenóide-6 (**14**, ver p.31), conocarpano (**15**, ver p.31)<sup>57</sup>.

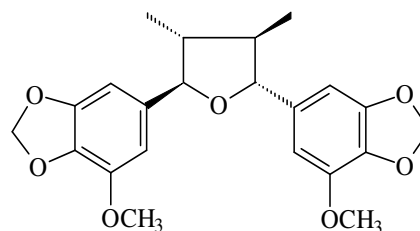


Eupomatenóide-3 (**24**)<sup>57</sup>

Dando prosseguimento as pesquisas com espécies de Piperaceas brasileiras, Martins e cols. (2003) submeteram as inflorescências de *Piper solmsianum* coletadas em outubro de 2000, na cidade de Ubatuba - São Paulo a uma investigação fitoquímica. Esta espécie medicinal foi anteriormente alvo de outras pesquisas fitoquímicas, as quais empregaram as folhas e os caules visando o isolamento e a identificação de compostos bioativos. O extrato acetato de etila foi submetido a procedimentos cromatográficos, resultando no isolamento de 2 fenilpropanóides: a elemicina e o siringaldeído, do ácido 3,4,5- trimetoxi benzóico, do esteróide sitosterol, junto com 3 lignanas tetrahidrofurânicas, rel - (7R, 8R, 7'R, 8'R) - 3',4'- metilenodioxi-3,4,5,5'- tetrametoxi - 7,7'- epoxilignana (**25**) e rel - (7R, 8R, 7'R, 8'R) - 3,4,3',4'- dimetilenodioxi - 5,5'- dimetoxi - 7,7'- epoxilignana (**26**)<sup>70</sup>.



Lignana tetrahidrofurano (**25**)<sup>70</sup>



Lignana tetrahidrofurano (**26**)<sup>70</sup>

Zheng, *et.al.* (2003) sintetizaram pela primeira vez o ( $\pm$ )-*epi*-Conocarpano (**18**, ver p.32) via o intermediário chave 5-bromo-*cis*-2-(4-metoxifenil)-3-metil-2,3, dihidrobenzofurano, o qual foi sintetizado por uma reação de inserção C-H

intramolecular catalizada pelo complexo Rutênio (II) porfirina usando o sal ariltosilhidrazona como fonte de carbeno, partindo-se do 5-bromo-2-hidroxiacetofenona comercialmente disponível<sup>69</sup>.

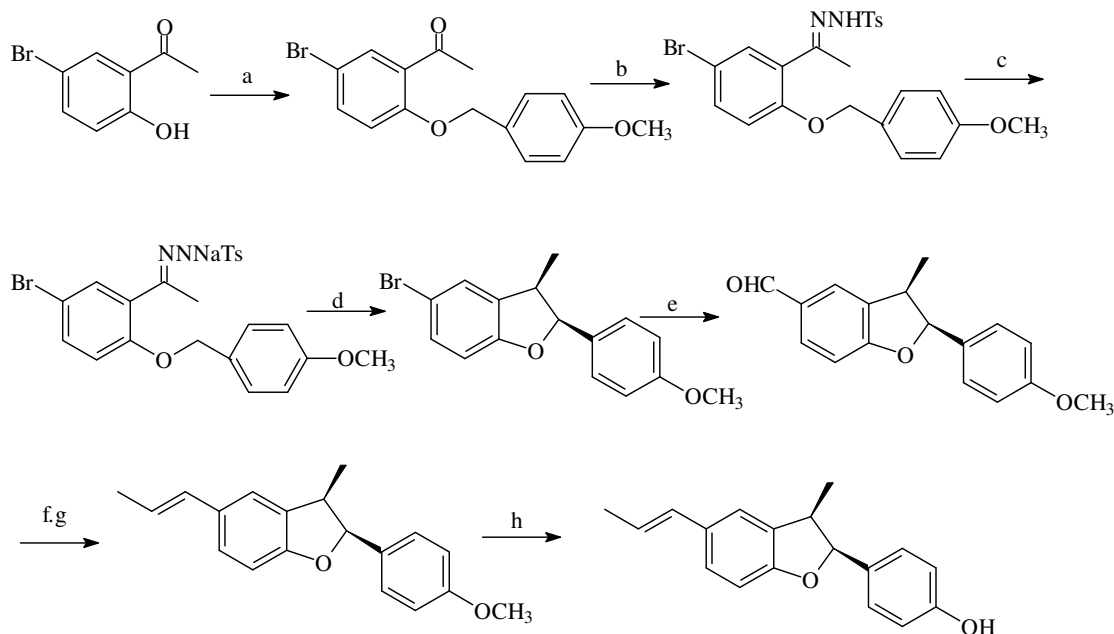
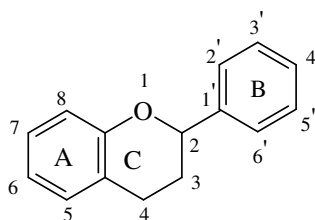


FIGURA 8 - (a) cloreto de *p*-metoxibenzil,  $K_2CO_3$ , irradiação de microondas, 99%; (b)  $TsNHNH_2$ , etanol, refluxo, 86%; (c) sódio, metanol; (d)  $Bn(Et)_3N^+Cl^-$ ,  $[Ru^{II}(TTP)(CO)]$ , tolueno, 60-70°C, 48h, 77% (2 passos, incluindo c e d); (e) *n*-BuLi, THF, 0,5h; DMF, -78-25°C, 1,5h, 48%; (f) *n*-BuLi, THF,  $(Ph)_3P^+EtBr^-$ , 79%; (g)  $PdCl_2 \cdot 2CH_3CN$ ,  $CH_2Cl_2$ , 93%; (h) *n*-BuLi,  $(Ph)_2PH$ , THF, 85%<sup>69</sup>

### 2.5.3 Flavonóides

A estrutura básica dos flavonóides é o núcleo flavano, que é constituído por 15 átomos de carbono arranjados em 3 anéis ( $C_6C_3C_6$ ). Nos compostos tricíclicos, as unidades são denominadas de A, B e C, conforme é demonstrado abaixo (**27**)<sup>71, 72</sup>. Sua estrutura deriva da  $\gamma$  - cromona (benzo- $\gamma$ -pirano), com um fenil na posição 2. Os átomos de carbono dos núcleos A, B e C recebem a numeração com números

ordinários para os núcleos A e C e os mesmos números seguidos de uma linha (') para o núcleo B<sup>31</sup>.



Estrutura básica dos flavonóides (27)

Os flavonóides constituem um grupo de pigmentos vegetais, oriundos da via biossintética do ácido acético e ácido chiquímico, os quais são amplamente distribuídos na natureza. Sua presença nos vegetais parece estar relacionada com funções de defesa (proteção contra raios ultravioleta, ações antifúngica, e antibacteriana) e de atração de polinizadores<sup>31</sup>.

Eles classificam-se de acordo com as suas variações estruturais, em<sup>39</sup>:

Flavonas (28) – apresentam dupla ligação entre as posições 2 e 3 e hidrogênio na posição 3<sup>39</sup>.

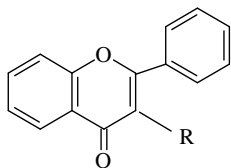
Flavonóis (29) – apresentam dupla ligação entre as posições 2 e 3 e OH na posição 3<sup>39</sup>.

Flavanonas (30) – sem duplas ligações, entre as posições 2 e 3 e hidrogênio na posição 3<sup>39</sup>.

Flavanonóis (31) - sem duplas ligações, entre as posições 2 e 3 e hidroxila na posição 3<sup>39</sup>.

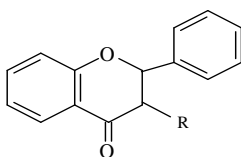
Chalconas (32) – Com Anel C aberto<sup>39</sup>.

Isoflavonas (33) – com o anel B na posição 3 (3-fenil - $\gamma$ - cromona)<sup>39</sup>.



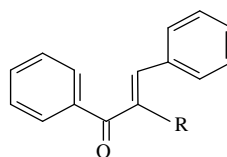
Flavona R = H (28)

Flavonol R = OH (29)

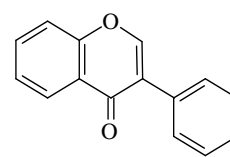


Flavanona = H (30)

Flavanonol = OH (31)



Chalcona (32)



Isoflavona (33)

Poucos flavonóides têm sido isolados de espécies de *Piper*. Dentre eles, salientamos o dado referente ao número de flavonas isoladas de *Piper* ser classificado como relativamente reduzido, destacando-se flavonas tri e tetraoxigenadas<sup>73</sup>. Segundo MOREIRA *et al.*(2000)<sup>50</sup> o isolamento de C-glucosilflavonóides são raros em espécies de *Piper*. As tabelas 5 e 6 demonstram as flavanonas e flavonas isoladas de espécies do gênero *Piper* respectivamente <sup>51</sup>.

TABELA 5 – Flavanonas de espécies do gênero *Piper*, PARMAR *et al.* (1997)<sup>51</sup>

FLAVANONA	PLANTA
5,7-dihidroxi flavanona	<i>P. hostmannianum</i> <i>P. steerni</i>
6-hidroxi-5,7-dimetoxi flavanona	<i>P. hispidum</i>
8-hidroxi-5,7-dimetoxi flavanona	<i>P. hispidum</i>
5-hidroxi-7-metoxi-6,8-dimetil flavanona	<i>P. hostmannianum</i>
Pinostrobin	<i>P. aduncum</i> <i>P. fadyenii</i> <i>P. hispidum</i> <i>P. steerni</i>
Sakuranetina	<i>P. aduncum.</i>
5,7,8-trimetoxi flavanona	<i>P. hispidum</i>

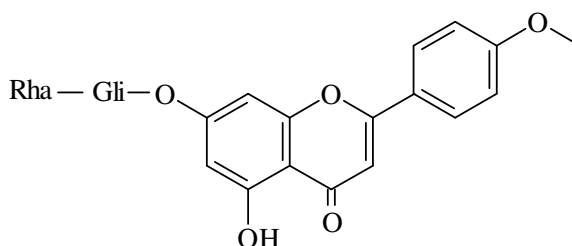
TABELA 6 – Flavonas de espécies do gênero *Piper*, PARMAR *et al.*(1997)<sup>51</sup>

FLAVONA	PLANTA
7,4'-dimetoxi-5,3'-diidroxiflavona	<i>P. auritum</i>
7,4'-dimetoxi-5-hidroxiflavona	<i>P. falconeri</i> <i>P. khasiana</i> <i>P. manauense</i> <i>P. manii</i> <i>P. peepuloides</i> <i>P. sylvaticum</i>
6-C-β-D- galactopiranosilacetina- 7 – O – glicose	<i>P. branchistachyum</i>
6 – C – β – D - glicopiranosilacetina- 7-O-glicose	<i>P. branchistachyum</i>
5-hidroxi-7,3',4'-trimetoxiflavona	<i>P. peepuloides</i> <i>P. sylvaticum</i>
Isoquercetina	<i>P. nigrum</i>
Isoramnetina 3-O-β-D-rutinese	<i>P. nigrum</i>
Kaempferol 3-O-β- rhamnose	<i>P. nigrum</i>
Kaempferol 3 –O –β - glicose	<i>P. nigrum</i>
Marginatose	<i>P. marginatum</i>
Quercetina-3-O-β- galactose	<i>P. nigrum</i>
Quercetina-3-O-β-D- rhamnose	<i>P. nigrum</i>
Quercetina-3-O-β-D- rutinese	<i>P. nigrum</i>
Rhamnetina O – triglicose	<i>P. nigrum</i>
Tectocrisina	<i>P. falconei</i> <i>P. manii</i>



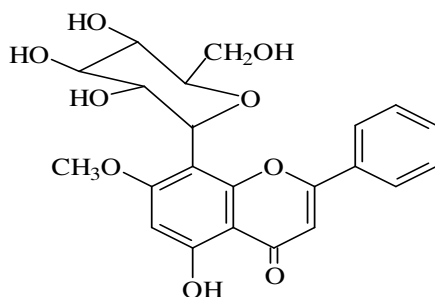
	<i>P. sylvaticum</i>
Veluxina	<i>P. clarkii</i>
Vitexina	<i>P. marginatum</i>

MOREIRA *et al.* (1995) isolaram do extrato metanólico das folhas de *Piper solmsianum* C.DC., coletadas no mês de Janeiro em Teresópolis-RJ, um sólido amarelo identificado como sendo a flavona 5-hidroxi-4'-metoxi-7-O-rutinosilflavona denominada acaciina (**34**)<sup>54,70</sup>.

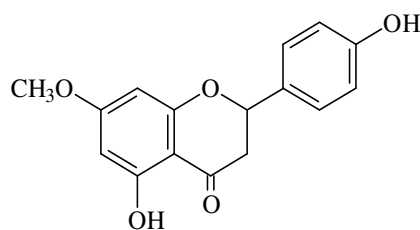


Acaciina (**34**)

As folhas de *Piper lhotzkyanum* foram investigadas fitoquimicamente por MOREIRA *et al.* (2000)<sup>50</sup> no qual foi possível isolar e identificar a flavona 5-hidroxi-7-metoxi-8-C- $\beta$ -glucosilflavona (Kaplanina)(**35**) e a flavanona sakuranetina (**36**), previamente isolada de *Piper aduncum*<sup>50</sup>.

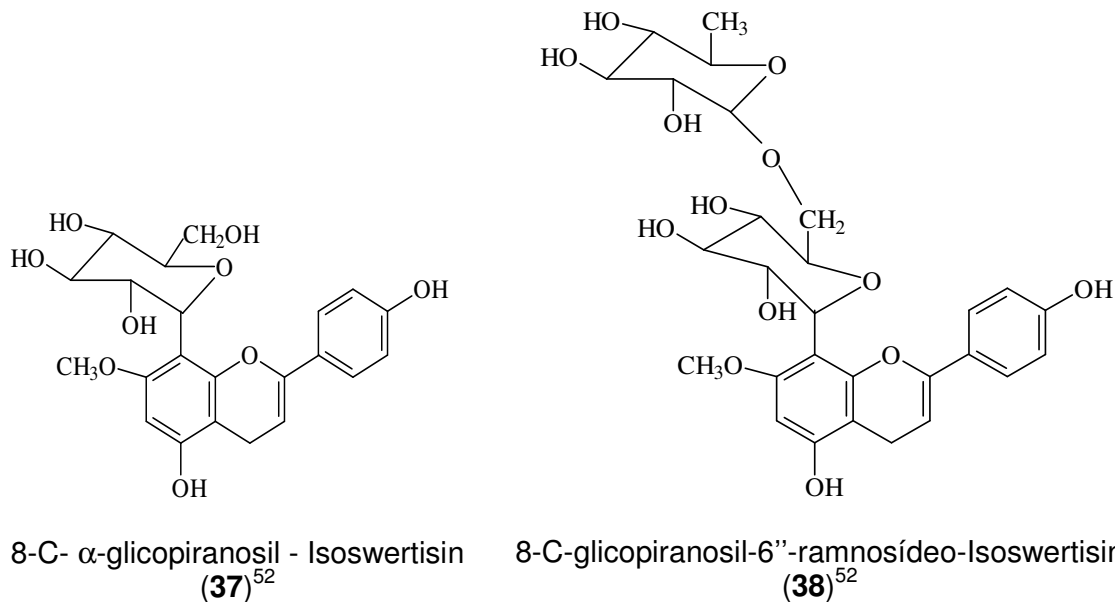


Kaplanina (**35**)

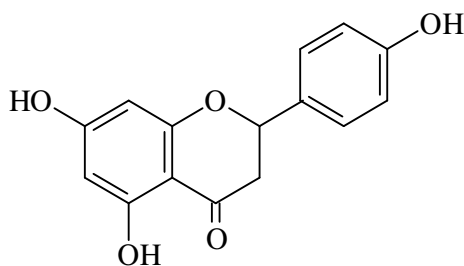


Sakuranetina (**36**)

A espécie medicinal *Piper mikanianum* (Kunth) Steudel foi estudada no aspecto químico por LEAL (2000) o qual isolou duas C-glicosilflavonas, 8-C-glicopiranosil-isoswertisina (**37**) e 8-C-glicopiranosil - 6''-ramnosideo-isoswertisina (**38**)<sup>52</sup>.



DANELUTTE *et.al.* (2003) realizaram estudo fitoquímico biomonitorado do extrato de acetato de etila das folhas *Piper crassinervium* Kunth através da técnica de bioautografia frente aos fungos *C. cladosporum* e *C. sphaerospermum*. Este trabalho resultou no isolamento de 2 flavanonas bioativas: 4',5,7-trihidroxi-flavanona (naringenina) (**39**) e 5,4'-dihidroxi-7-metoxiflavanona (sakuranetina) (**36**, ver p.39) junto com 3 hidroquinonas preniladas<sup>74</sup>.



Naringenina (**39**)<sup>74</sup>

## 2.6 ATIVIDADES BIOLÓGICAS DE ALGUMAS ESPÉCIES DO GÊNERO *PIPER*

Estudos com extratos de diferentes espécies de *Piper* têm mostrado uma grande diversidade de metabólitos com marcantes atividades biológicas. A grande importância deste gênero está baseada não somente na utilização de suas inúmeras espécies como plantas medicinais, mas também como fonte de matéria-prima para a indústria farmacêutica, cosmética e de perfumes.

Estudos farmacológicos realizados com a piperina (**12, ver p. 28**), amida isolada dos frutos e raízes de *Piper longum* L. e dos frutos de *Piper nigrum* L. espécies vegetais conhecidas popularmente por pimenta-longa e pimenta-do-reino respectivamente, demonstraram as seguintes atividades: depressora do sistema nervoso central, antipirética, antiinflamatória, antifúngica e antibacteriana<sup>51,75,76</sup>.

As folhas da espécie medicinal da flora cubana *Piper ossanum*, foi alvo de uma investigação fitoquímica visando uma avaliação da atividade antiúlceroza por COFFIGNY, *et.al.* (2000). A equipe de pesquisadores isolou a flavona 2''-O-ramnosil-4''-O-metil-vitexina do extrato etanólico a 70 % e posteriormente, administraram por via oral a solução deste flavonóide (0,5 mg/mL em água destilada) em ratos machos *Wistar*. Consideraram um grupo controle negativo – água e um grupo controle positivo – sucralfato, pela sua reconhecida atividade antiúlceroza. Empregaram o modelo de stress por imobilização e frio para produzir a lesão gástrica. A solução do flavonóide demonstrou uma evidente atividade antiúlceroza expressada pelo índice de lesão e porcentagem de inibição de formação de lesões. Portanto, concluíram que este flavonóide atuou como um antiúlcerozo similar ao sucralfato<sup>77</sup>.

Os pesquisadores FREIXA, *et al.* (2001)<sup>67</sup> monitoraram algumas frações obtidas pelo fracionamento do extrato bruto das folhas de *Piper fulvescens* avaliando a atividade antifúngica pelo método da bioautografia. As cromatoplasmas demonstraram o potencial fungicida pela revelação das manchas. Por métodos cromatográficos isolaram e purificaram 3 compostos, os quais foram identificados por técnicas espectroscópicas como sendo o eupomatenóide-5 (**16, ver p.32**), o conocarpano (**15,**

ver p.31), e o eupomatenóide-6 (14, ver p.31). Determinaram a concentração inibitória mínima das 3 neolignanas, contra as cepas dos fungos: *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans*, *Microsporium gypseum*, *Sacharomyces cerevisiae* e *Trichophyton mentagrophytes*. Dos 3 compostos isolados o conocarpano foi o que demonstrou maior potencial fungicida, entretanto o eupomatenóide-6 foi o mais ativo contra fungos dermatófitos <sup>67</sup>.

Segundo WILLIAMSON (2001)<sup>78</sup>, a espécie medicinal *Piper methysticum*, conhecida popularmente por Kava-Kava, é utilizada como tranqüilizante e ansiolítico para o tratamento da ansiedade em estágio moderado, como uma alternativa para os benzodiazepínicos, isto é, reduzindo a excitabilidade no sistema límbico. Os princípios ativos do Kava-Kava são as cavopironas: metisticina, diidrometisticina, Kavaína (10, ver p.6) e diidrokaína (11, ver p.6)<sup>7,78</sup>.

HOLETZ, *et al.* (2002) selecionaram 13 plantas medicinais brasileiras utilizadas na medicina popular para o tratamento de doenças infecciosas, entre elas a *Piper regnellii* Miq. Foi avaliada a atividade antimicrobiana, através do método da bioautografia, do seu extrato etanol/água (90/10) obtido das suas folhas contra bactérias e fungos. O extrato hidroalcoólico da *Piper regnellii* apresentou uma boa atividade contra *Staphylococcus aureus* e *Bacillus subtilis*, uma atividade moderada contra *Pseudomonas aeruginosa*, e uma fraca atividade contra *Escherichia coli*, conforme os dados da concentração inibitória mínima (CIM), demonstrado na Tabela 7 abaixo<sup>79</sup>.

TABELA 7 – Concentração Inibitória Mínima (CIM) de *P. regnellii* <sup>79</sup>

Planta	CIM (µg/mL)							
	ATIVIDADE ANTIBACTERIANA				ATIVIDADE ANTIFÚNGICA			
<i>P. regnellii</i>	1	2	3	4	5	6	7	8
	7,8	15,6	1000	250	> 1000	125	> 1000	500

NOTA: 1 – *Staphylococcus aureus*; 2 – *Bacillus subtilis*; 3 – *Escherichia coli*; 4 – *Pseudomonas aeruginosa*; 5 – *Candida albicans*; 6 – *Candida krusei*; 7 – *C. parapsilosis*; 8 – *C. tropicalis*.

CHAVES e SANTOS (2002) submeteram o extrato hexânico obtido das folhas de *Piper marginatum* Jacq., espécie vegetal conhecida vulgarmente como Malvarisco

para avaliação do seu potencial cercaricida. A presente pesquisa demonstrou que o extrato hexânico apresenta uma significativa atividade contra as cercárias, larvas do *Schistosoma mansoni*, helminto causador da esquistossomose<sup>80</sup>.

PESSINI e cols. (2003) isolaram dos extratos hidroalcolólico e acetato de etila preparados com folhas de *Piper regnellii* (Miq.) C.DC. var. *pallescens* (C.DC.) Yunck as neolignanas identificadas como eupomatenóide-6 (**14**, ver p.31), eupomatenóide-5 (**16**, ver p.32), eupomatenóide-3 (**24**, ver p.35) e conocarpano (**15**, ver p.31). Visando a obtenção de compostos mais ativos, submeteram as neolignanas isoladas a um processo de metilação com diazometano e obtiveram os derivados metilado do eupomatenóide-6 (**40**), do eupomatenóide-5 (**41**) e do conocarpano (**42**). Posteriormente, avaliaram o potencial antimicrobiano dos extratos hidroalcolólico e acetato de etila, das neolignanas e dos derivados metilados contra bactérias gram-positivas e gram-negativas através do ensaio da bioautografia e técnicas de microdiluição para a determinação da concentração inibitória mínima (CIM) e da concentração bacteriostática mínima (CBM). Como padrões de comparação foram usados os antimicrobianos: tetraciclina, vancomicina e penicilina. O potencial antibacteriano está demonstrado nas Tabelas 8 e 9 abaixo<sup>81</sup>.

TABELA 8 – CIM e CBM dos extratos aquosos e acetato de etila das folhas de *P. regnellii* var. *pallescens*, e antibióticos de referência contra uma série de microrganismos<sup>81</sup>

ORGANISMO	CIM(CBM) µg/mL		
	EX. ETANOL/ÁGUA	EX. ACETATO ETILA	ANTIBIÓTICO REF.
<i>Staphylococcus aureus</i>	1000	15,62 (15,62)	0,00975 <sup>(1)</sup>
<i>Bacillus subtilis</i>	1000	15,62 (15,62)	0,18 <sup>(2)</sup>
<i>Escherichia coli</i>	> 1000	>1000	0,78 <sup>(3)</sup>
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	> 1000	>1000	3,125 <sup>(3)</sup>

(1) penicilina

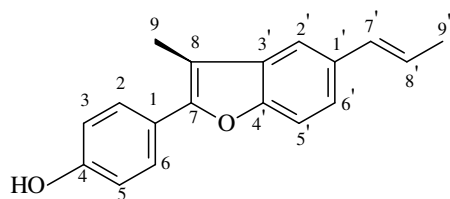
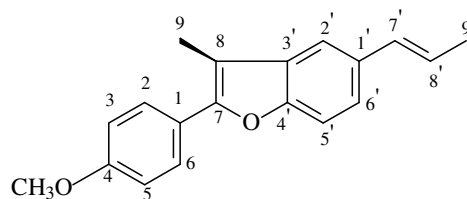
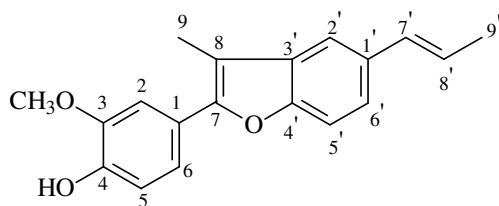
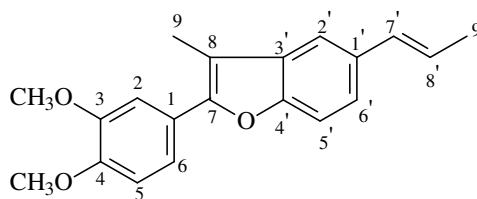
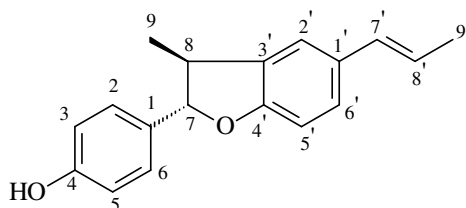
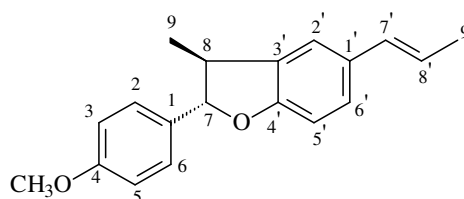
(2) vancomicina

(3) tetraciclina.

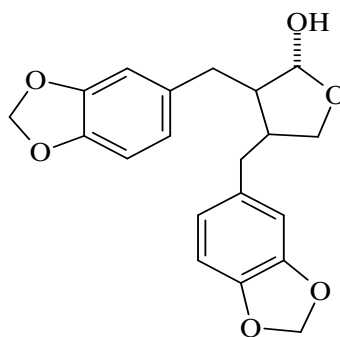
TABELA 9 – Concentrações inibitórias mínimas e concentrações mínimas bactericidas dos compostos puros e seus derivados obtidos folhas de *P. regnellii* var. *pallescentis*<sup>81</sup>

NEOLIGNANAS, DERIVADOS E ANTIMICROBIANOS DE REFERÊNCIA	ATIVIDADE ANTIBACTERIANA µg/mL							
	<i>Staphylococcus aureus</i>		<i>Bacillus subtilis</i>		<i>Escherichia coli</i>		<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	
	CIM	CBM	CIM	CBM	CIM	CBM	CIM	CBM
Eupomatenóide – 6	3,12	3,12	3,12	3,12	> 100	-	> 100	-
Eupomatenóide -5	1,56	3,12	3,12	3,12	> 100	-	>100	-
Eupomatenóide – 3	>100	-	>100	-	>100	-	> 100	-
Conocarpano	6,25	6,25	6,25	6,25	>100	-	>100	-
Eupomatenóide-6 metilado	> 100	-	>100	-	> 100	-	> 100	-
Eupomatenóide-5 metilado	> 100	-	>100	-	> 100	-	> 100	-
Conocarpano metilado	> 100	-	>100	-	> 100	-	> 100	-
Penicilina	0,000975	-	-	-	-	-	-	-
Vancomicina	-	-	0,18	-	-	-	-	-
Tetraciclina	-	-	-	-	0,78	-	3,125	-

Os extrato hidroalcolico apresentou uma fraca atividade antimicrobiana contra *S. aureus* e *B. subtilis* ambos com CIM e CBM de 1000 µg/mL. O extrato acetato de etila apresentou uma boa atividade contra *S. aureus* e *B. subtilis* com CIM e CBM de 15,62 µg/mL. Os extratos foram inativos para bactérias gram-negativas nas concentrações > 1000 µg/mL. O conocarpano demonstrou uma boa atividade contra *S. aureus* e *B. subtilis* ambos com CIM de 6,25 µg/mL. O eupomatenóide-6 e eupomatenóide-5 apresentaram uma boa atividade contra *S. aureus* com CIM de 3,12 e 1,56 µg/mL, respectivamente. Ambos os compostos apresentaram CIM de 3,12 µg/mL. O eupomatenóide-3 e todos os derivados metilados foram inativos contra todas as bactérias testadas<sup>81</sup>.

Eupomatenóide - 6 (14)<sup>81</sup>Derivado metilado do Eupomatenóide - 6  
(40)<sup>81</sup>Eupomatenóide - 5 (16)<sup>81</sup>Derivado metilado do Eupomatenóide - 5  
(41)<sup>81</sup>Conocarpano (15)<sup>81</sup>Derivado metilado do Conocarpano (42)<sup>81</sup>

De acordo com OLIVEIRA e BASTOS (2003), foi isolada da espécie medicinal *Piper cubeba* a neolignana cubebina (43), a qual apresenta ação tripanossomicida. Esta molécula foi selecionada como protótipo para uma série de derivados semi-sintéticos com vistas ao desenvolvimento de um novo medicamento para o tratamento da doença de chagas<sup>24</sup>.

Cubebina (**43**)<sup>24</sup>

A equipe de pesquisadores PESSINI e cols. (2005) prosseguindo as pesquisas biológicas, testaram o extrato bruto de acetato de etila obtido das folhas de *Piper regnellii* (Miq.) C.DC. var. *pallescens* (C.DC.) Yunck em relação a atividade antifúngica pelo método da bioautografia e técnicas de microdiluições, para determinar as concentrações inibitórias mínimas (CIM) sobre as leveduras *Candida albicans*, *Candida krusei*, *Candida parapsilosis* e *Candida tropicalis*. O extrato acetato de etila apresentou uma boa atividade contra *Candida albicans* com uma CIM de 125 µg/mL, moderada atividade contra *Candida krusei*, *C. parapsilosis* com uma CIM de 500 µg/mL e foi inativo contra *C. tropicalis* com uma CIM superior a 1000 µg/mL. As frações hexano e clorofórmio mostraram variados níveis de atividade antifúngica contra as leveduras testadas. Posterior separação da fração hexânica em cromatografia de coluna resultou nas substâncias puras eupomatenóide-6 (**14**, ver p.31), eupomatenóide-5 (**16**, ver p.32), eupomatenóide-3 (**24**, ver p.35) e conocarpano (**15**, ver p.31). O conocarpano foi a única substância isolada, com atividade contra as leveduras, Conforme é demonstrado na tabela 10 abaixo<sup>82</sup>.

TABELA 10 – Concentração inibitória mínima (CIM) e concentração fungicida mínima (CFM) dos extratos, frações e compostos obtidos das folhas de *Piper regnellii*<sup>82</sup>.

MATERIAL TESTADO	CIM (CFM) / µg mL <sup>-1</sup>			
	<i>C. albicans</i>	<i>C. hrusei</i>	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. tropicalis</i>



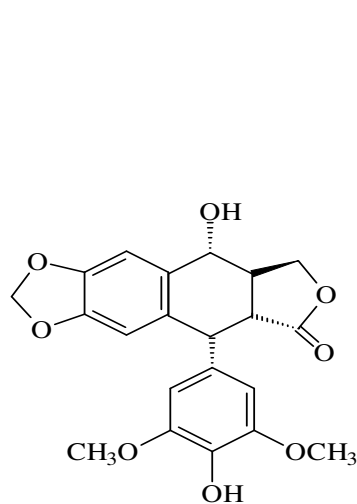
Extrato Aquoso	Inativo	inativo	Inativo	Inativo
Extrato Acetato de etila	125 (250)	500(1000)	500 (1000)	Inativo
Fr. Hexânica	62,5 (62,5)	125 (250)	125 (250)	125 (250)
Fr. Clorofórmica	62,5 (62,5)	500(1000)	31,2 (62,5)	125 (250)
CHCl <sub>3</sub> /Ac. etila (19:1)	> 100	> 100	> 100	> 100
CHCl <sub>3</sub> /Ac. etila (9:1)	> 100	> 100	> 100	> 100
CHCl <sub>3</sub> /Ac. etila (1:1)	> 100	> 100	> 100	> 100
Acetato de etila	> 100	> 100	> 100	> 100
Acetona	> 100	> 100	> 100	> 100
Metanol	> 100	> 100	> 100	> 100
Metanol/ água (9:1)	> 100	> 100	> 100	> 100
Eupomatenóide-6	> 100	> 100	> 100	> 100
Eupomatenóide-5	> 100	> 100	> 100	> 100
Eupomatenóide-3	> 100	> 100	> 100	> 100
Conocarpano	6,3 (6,3)	12,5 (25)	25 (50)	6,3 (12,5)
C. positivo Nistatina	1,0 (n.d.)	4,0 (n.d.)	8,0 (n.d.)	8,0 (n.d.)

NOTAS: Amostras com CIM > 1000µg mL<sup>-1</sup> foram consideradas inativas e n.d. não determinado.

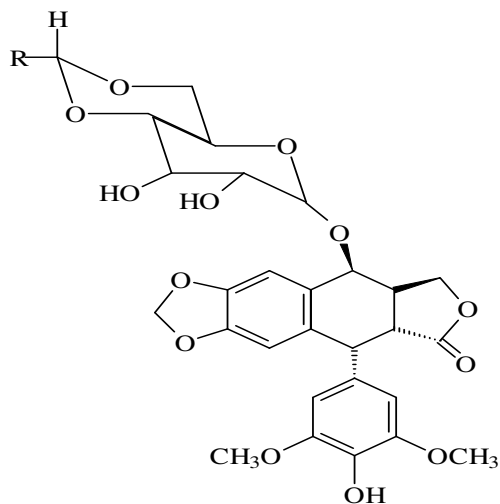
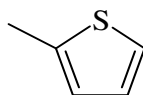
## 2.7 O POTENCIAL BIOLÓGICO DAS LIGNANAS, NEOLIGNANAS E DOS FLAVONÓIDES

As lignanas e neolignanas têm atraído o interesse dos pesquisadores nestes anos devido a sua larga distribuição na natureza, pois parecem exercer um papel importante na defesa das plantas, atuando como agentes antimicrobianos, antifúngicos e inseticidas. Esta classe de compostos também tem despertado grande interesse biológico em virtude de suas propriedades terapêuticas, como: antitumoral, antiviral, antihipertensiva, sedativa, antibacteriana, inibidora do crescimento de plantas, antifúngica, antiinflamatória, citotóxica, anti-PAF (fator de agregação plaquetária) e anti -LTB<sub>4</sub> (mediador químico da inflamação, leucotrieno)<sup>24,63</sup>.

O etoposídeo (**44**) (Veperide<sup>®</sup>) e o teniposídeo (**45**) (Vumon<sup>®</sup>) constituem-se nos dois importantes derivados semi-sintéticos adicionados ao arsenal quimioterapêutico contra o câncer de testículo, pulmão e algumas formas de leucemia. Foram obtidos a partir da lignana podofilotoxina (**46**) e atuam inibindo a enzima topoisomerase II<sup>16, 24</sup>.

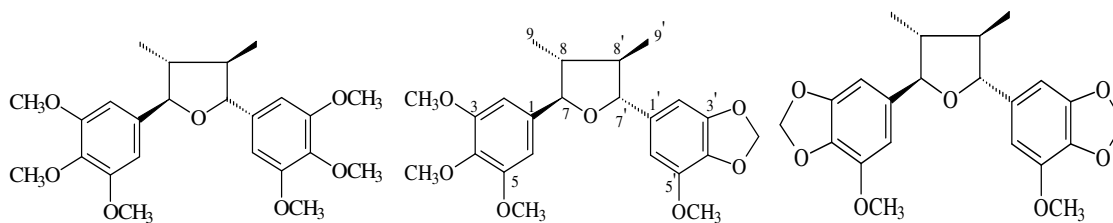


Podofilotoxina (46)

Etoposídeo R = CH<sub>3</sub> (44)

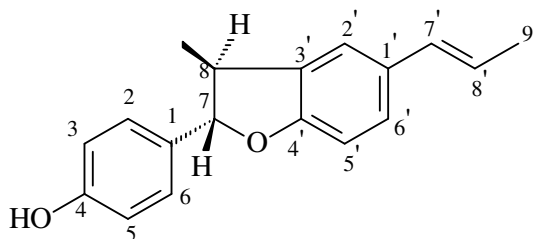
Tenitoposídeo R = (45)

Segundo MARTINS, *et. al.* (2003), as lignanas grandisina (22), rel-(7R,8R,7'R,8'R)-3',4'-metilenodioxi-3,4,5,5'-tetrametoxi-7,7'-epoxilignana (47) e rel-(7R,8R,7'R,8'R)-3,4,3',4'-dimetilenodioxi-5,5'-dimetoxi-7,7'-epoxilignana (48) tem demonstrado ser *in vitro* um potente composto antichagásico, contra a forma tripomastigota de *Trypanosoma cruzi*<sup>70</sup>.



Grandisina (22)    Lignana tetrahydrofurano (47)    Lignana tetrahydrofurano (48)

PESSINI, *et. al.* (2005) relata que a neolignana benzofurânica conocarpano tem demonstrado atividade fungicida contra as cepas de *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans*, *Saccharomyces cerevisiae*, bem como contra os fungos dermatófitos *Microsporum gypseum* e *Tricophyllum mentagrophytes*<sup>82</sup>.



Conocarpano (**15**)<sup>82</sup>

Muitos estudos têm demonstrado que os flavonóides apresentam inúmeras atividades biológicas, como: antialérgica, antiviral, antiinflamatória e ação vasodilatadora, aumentam a resistência da parede dos vasos sanguíneos, antitrombótico, diminuem os riscos de doenças coronarianas, estrogênica, antitumoral, antibacteriana, antifúngica, antiespasmódica e combate úlcera gástrica<sup>71, 83, 84, 85, 86</sup>.

Entretanto, a maioria das pesquisas têm sido direcionadas para a atividade antioxidante dos polifenóis a qual deve-se a sua capacidade de reduzir a formação de radicais livres, bem como a sua captura, e assim prevenir os efeitos deletérios dos radicais livres no corpo humano<sup>71</sup>.

## 2.8 PRODUTOS NATURAIS X ANTIMICROBIANOS

Os produtos naturais têm tido um papel relevante no desenvolvimento de fármacos antimicrobianos. Dos 12.000 antibióticos conhecidos em 1995, 55 % foram produzidos por bactérias filamentosas do gênero *Streptomyces*, 11 % de outros *Actinomycetes*, 12 % de bactérias não filamentosas e 22 % de fungos filamentosos<sup>87,88</sup>.

A ação seletiva exercida pelos metabólitos secundários produzidos por microorganismos sobre bactérias patogênicas e fungos gerou a era dos antibióticos e por 50 anos temos nos beneficiado desta propriedade notável destes medicamentos maravilhosos, como os beta-lactâmicos (primeiro introduzido em 1941), aminoglicosídeos (1944), cefalosporinas (1945), cloranfenicol (1949) tetraciclina (1950), macrolídeos (1952), os lincosamidas (1952), estreptograminas (1952), glicopeptídeos (1956), rifamicinas (1957) e lipopeptídeos (2003). O sucesso foi tão

impressionante que estes antibióticos foram virtualmente os únicos fármacos utilizados pela quimioterapia contra microorganismos patogênicos<sup>87, 88</sup>.

Apesar da introdução em 2000 e 2003 das duas primeiras novas classes de antibacterianos, as pesquisas na área de antimicrobianos estão em crise, diminuíram cerca de 50 % desde 1968, devido a dificuldade e o alto custo de se isolar estruturas químicas e agentes inéditos com novos modos de ação. Esta crise coincide com a necessidade urgente por novos e melhores fármacos antibacterianos devido a natureza comum da resistência das bactérias a estes medicamentos<sup>87,88</sup>.

Por outro lado, nos últimos vinte anos, a frequência das infecções fúngicas sistêmicas, principalmente as oportunistas invasivas, têm crescido drasticamente. Entre estas, as mais comuns são: candidíase e criptococose, seguida da aspergilose, que apresenta maior mortalidade. O aumento no número de infecções fúngicas deve-se a fatores como: imunossupressão causada pela Síndrome da Imunodeficiência Adquirida ou induzida para transplante de medula óssea ou de órgãos sólidos (5 % para transplante de rim, 15-35 % para transplante do coração e pulmão e até 40 % para transplante de fígado) ou ainda, resultante da quimioterapia com antitumorais. Outros possíveis fatores incluem o uso indiscriminado de antimicrobianos de largo espectro, o uso crônico de corticóides, a prática de procedimentos médicos invasivos (cirúrgias), o uso de catéteres, como na nutrição parenteral e hemodiálise. Também deve ser considerado o envelhecimento populacional, que existe principalmente nos países desenvolvidos e é uma tendência natural<sup>88, 89</sup>. O fato do organismo do hospedeiro encontrar-se imunologicamente comprometido torna-o susceptível para o desenvolvimento de fungos oportunistas, os quais tornam-se patogênicos<sup>90</sup>.

A gravidez é outro fator predisponente as micoses. Neste período ocorre uma elevação nos níveis de estrogênio no organismo feminino e com isso, o pH vaginal torna-se ácido, favorecendo o desenvolvimento das infecções fúngicas, principalmente da *Candida sp*. A candidíase chega a acometer 17 a 31 % das gestantes, um valor considerado muito alto<sup>90</sup>.

O número de fármacos disponíveis para o tratamento de infecções fúngicas sistêmicas é limitado. Comumente, os tratamentos incluem os derivados imidazóis

(cetoconazol e fluconazol) ou os polienos naturais (anfoterecina B e nistatina). Entretanto, o emprego está se tornando limitado pela resistência desenvolvida pelos azóis e o seu efeito teratogênico para gestantes (defeitos de ossificação craniofacial, fenda palatina e dilatação da pélvis renal) e a nefrotoxicidade dos polienos<sup>89,90</sup>.

Perante a escassez de fármacos disponíveis para o tratamento de micoses, problemas com recidivas, o aparecimento de cepas resistentes e a significativa toxicidade, como as descritas acima, comprometem a eficácia da terapia com os agentes antifúngicos existentes<sup>89</sup>.

Diante desta realidade, se fazem necessárias pesquisas que visem o desenvolvimento de novas substâncias antimicrobianas para o tratamento de infecções bacterianas e fúngicas, pois é grave e preocupante a resistência aos agentes antimicrobianos.

Do ponto de vista da indústria farmacêutica, as espécies vegetais em si têm pouco valor. A exportação pura e simples de matéria-prima não gera riqueza. Agregamos valor as plantas se as conhecemos bem, a ponto de obter delas material purificado, por meio de tecnologia moderna desenvolvida em universidades e centros de pesquisa. O produto purificado e com indicações biológicas, tem elevado valor no mercado internacional e pode render divisas para o país. Só a ciência pode agregar valor à biodiversidade. Um diamante lapidado vale consideravelmente mais que a pedra bruta<sup>30</sup>. Desta forma, possibilitamos num futuro, que o Brasil venha ocupar um lugar que merece no desenvolvimento de fitoterápicos e fitofármacos.

Portanto, cabem as nossas Universidades, aos cursos de pós-graduação um enorme desafio científico, o de transformar um imenso patrimônio natural, em riqueza de compostos bioativos para a medicina, gerando matéria-prima para o desenvolvimento de novos fármacos capazes de combater patologias de grande complexidade como o câncer, a AIDS, infecções bacterianas e fúngicas. Sendo assim, é importante ressaltar, que os sucessos destas pesquisas dependem do grau de interação entre a química, botânica sistemática, farmacologia e a microbiologia. A integração destas áreas na pesquisa de plantas medicinais conduz a um caminho promissor e eficaz para a descoberta de novos medicamentos.

Neste contexto a avaliação do potencial biológico das neolignanas e dos flavonóides isolados de plantas brasileiras é, sem dúvida, um caminho promissor que poderá contribuir para o progresso da química medicinal no Brasil e para a inovação farmacêutica<sup>24</sup>.

Entre a diversidade de espécies medicinais presentes na flora brasileira e empregada pela população em virtude das suas propriedades terapêuticas, destacamos a *Piper solmsianum* C. DC., variedade *solmsianum* (Piperaceae) como proposta para o desenvolvimento da presente pesquisa visando a sua validação científica e assim, poder contribuir com a bioprospecção da biodiversidade brasileira.

### 3. OBJETIVOS

O presente trabalho tem por objetivos:

- a) Isolar, purificar e identificar os constituintes químicos ativos das frações de *Piper solmsianum* C.DC. (Piperaceae) por meio de métodos físicos e físico-químicos convencionais;
- b) Avaliar a atividade antifúngica do extrato bruto, frações e compostos puros obtidos de *Piper solmsianum* C.DC. contra diferentes fungos patogênicos aos seres humanos;
- c) Avaliar a atividade antinociceptiva do extrato bruto, frações e com os compostos puros obtidos de *Piper solmsianum* C.DC. nos modelos experimentais das contorções abdominais induzidas pelo ácido acético e da formalina em camundongo;
- d) Realizar estudos de modificação estrutural com a neolignan benzofurânica conocarpano isolada das folhas de *Piper solmsianum* na tentativa de se obter compostos mais potentes;
- e) Comparar a composição química dos diferentes órgãos vegetais (folhas, flores, caules e raízes) de *Piper solmsianum* C.DC (Piperaceae) em relação a variação sazonal por cromatografia gasosa (CG/FID) e cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).

## 4. PARTE EXPERIMENTAL

### 4.1 MATERIAL E MÉTODOS

#### 4.1.1 Equipamentos

No preparo dos extratos foi usado percolador de inox para a maceração do material vegetal. Os extratos foram concentrados em rota-vapor BÜCH RE – 120 acoplado a um banho-maria IKA – HEIZBAD HB – 250 com controle de temperatura.

Os extratos, frações e os compostos foram pesados em balança analítica SHIMADZU LIBROR AEG – 220 e SHIMADZU LIBROR EB – 330 D.

O ponto de fusão dos compostos isolados foram determinados em aparelho digital da marca Micro Química - MQAPF modelo 301.

#### 4.1.2 Reagentes

Os solventes utilizados no processo de extração, partição líquido-líquido, fracionamento e purificação dos compostos são de pureza analítica da Merck e Reagen. Os solventes utilizados nas análises em CG e CLAE são da Tedia grau – HPLC e ácido ortofosfórico da Nuclear, hidróxido de sódio, cloreto de benzoíla, ácido clorídrico, sulfato de dimetila, sulfato de sódio anidro, anidrido acético, isoeugenol, cloreto férrico hexahidratado, ácido trifluoracético.

#### 4.1.3 Métodos Cromatográficos

##### 4.1.3.1 Cromatografia em camada delgada (CCD)

As cromatografias em camada delgada foram realizadas em placas de sílica-gel 60 GF<sub>254</sub>, de 0,2 mm de espessura e preparadas sobre folhas de alumínio, de procedência Merck.



Para a visualização da fluorescência dos compostos nas CCDs, as placas foram reveladas sob luz ultravioleta *Mineralight* 254 e 365 nm. Posteriormente, as cromatoplasas foram nebulizadas com reveladores químicos específicos para cada grupo de princípio ativo, por meio de um pulverizador manual, quando necessário, foram aquecidas à temperatura de 110°C, em estufa FANEM para secagem e esterilização, modelo 315 SE<sup>42</sup>.

Os reveladores químicos empregados nas CCD foram: Anisadeído sulfúrico para a detecção de esteróides, terpenos, lignanas e neolignanas onde verificou-se o desenvolvimento de manchas arroxeadas, rosadas e avermelhadas para os esteróides e terpenos, azuladas para lignanas e neolignanas. Solução etanólica de hidróxido de potássio a 5 % para a detecção de cumarinas e observou-se em câmara fechada, sob luz ultravioleta, nos comprimentos de onda de 360 nm, em caso positivo, apresenta fluorescência intensa de coloração azul a azul esverdeada característica. Reativo de Dragendorff para a detecção de alcalóides e xantinas e observou-se a coloração laranja característica. Solução etanólica a 3 % de cloreto férrico (FeCl<sub>3</sub>) para a detecção de polifenóis e observou-se a coloração verde escuro ou preta para os flavonóides e azul.

#### 4.1.3.2 Cromatografia em coluna (CC)

As colunas cromatográficas (CC) foram escolhidas de acordo com a quantidade de material a ser adsorvido e sílica – gel 60 de granulometria 70 – 230 *mesh* ( $\phi$  = 0,05 – 0,20 mm) Carlo Erba e Merck como adsorvente. As eluições foram feitas com solventes orgânicos, em ordem crescente de polaridade. As frações foram reunidas conforme as semelhanças de R<sub>f</sub> observadas por cromatografia em camada delgada (CCD).

#### 4.1.3.3 Cromatografia gasosa (CG/FID)

Para as análises cromatográficas dos extratos, foi utilizado um cromatógrafo gasoso equipado com detector de ionização de chama (CG-FID) da marca Shimadzu

modelo GC-14B. A coluna empregada foi uma DB1 (Agilent) com 30 m x 0,25  $\mu$  de diâmetro interno. As amostras foram injetadas no cromatógrafo com auxílio de uma microseringa tipo Hamilton. O processamento de conversão dos dados analógicos para digital foi realizado através do *software* Microquímica.

#### 4.1.3.4 Cromatografia líquida de alta resolução (CLAE)

As análises cromatográficas líquidas foram realizadas em aparelho HPLC – Waters PAD 2996, gerenciado por *software Empower* versão Pro e detector por arranjo de fotodiodo em UV – VIS (PAD 2996). A coluna cromatográfica empregada foi C<sub>18</sub> (Phenomenex) modelo *Synergi Fusion* de dimensões 250 x 4,6mm, dotada de pré-coluna com as mesmas especificações. O *loop* de injeção utilizado foi de 20  $\mu$ L acoplado ao sistema injetor manual (Rheodyne 7725i) seguido do degaseificador (in line Degasser AF) e bomba propulsora modelo 60F.

Os extratos foram filtrados em filtros de membrana *Millipore* de 0,45  $\mu$ m e 13 mm e os solventes utilizados para a fase móvel foram filtrados por Filtro de membrana RC-L 58 0,2  $\mu$ m, diâmetro  $0,47 \pm 0,5$ mm da marca *Schleider & Schuell*. O solvente foi degaseificado em aparelho ultrassom da marca *Ultrasonic Cleaner* USC 1400 a vácuo pela Bomba de Vácuo da marca Tecnal TE O58 o tempo suficiente para a eliminação de todas as bolhas.

#### 4.1.4 Identificação e Caracterização dos Compostos

##### 4.1.4.1 Infravermelho (IV)

Para a obtenção dos espectros na região de absorção do Infravermelho (IV) utilizou-se um espectrômetro FT PERKIN ELMER 16PC, em pastilhas de KBr. Os valores foram registrados em centímetros recíprocos ( $\text{cm}^{-1}$ ).

#### 4.1.4.2 Espectrometria de ressonância magnética nuclear de hidrogênio e carbono-13 (RMN $^1\text{H}$ e RMN $^{13}\text{C}$ )

Para a obtenção dos espectros de RMN  $^1\text{H}$  e de  $^{13}\text{C}$  foram usados os aparelhos BRUCKER AC – 200 F ( $^1\text{H}$  200 MHz e  $^{13}\text{C}$  50MHz, Universidade Federal de Santa Catarina) e VARIAN, GEMINI 300 ( $^1\text{H}$  300 MHz e  $^{13}\text{C}$  75 MHz), Universidade Católica de Sacro Cuore/Roma), empregando-se solventes deuterados. Os deslocamentos químicos foram registrados em valores adimensionais  $\delta$  (ppm), tendo como referência interna o tetrametilsilano (TMS). Os registros das constantes de acoplamento foram feitos em Hertz (Hz), e a multiplicidade dos sinais foram indicados como segue: s = simpleto, d = duplete, dd = duplo duplete, dq = duplo quarteto, t = tripleto e m = multipleto.

#### 4.1.4.3 Espectrometria de massas (EM)

Para a obtenção do espectro de CG/EM foi utilizado o aparelho da SHIMADZU – CG/MS modelo QP 2000 A, sobre impacto de feixe eletrônico a 70 eV acoplado a cromatografia gasosa para análise de mistura de compostos.

### 4.2 COLETA E IDENTIFICAÇÃO DO MATERIAL VEGETAL

A espécie vegetal selecionada para a presente investigação fitoquímica e biológica foram às folhas de *Piper solmsianum* C. DC. var. *solmsianum*, pertencente a família Piperaceae.

O material vegetal acima citado foi coletado em maio de 2001, no município de Ponta Grossa/Paraná. Posteriormente, foi fragmentado a pequenos pedaços e exposto ao sol, a temperatura de 25°C, durante 5 dias para a sua completa dessecação. O material foi armazenado para a realização do presente estudo.

Uma exsiccata foi preparada com o material vegetal fértil e enviada para o herbário do Jardim Botânico do Rio de Janeiro, para a sua identificação taxonômica.

Este material foi analisado e identificado pela botânica sistemática Dr. Elsie Franklin Guimarães, como sendo *Piper solmsianum* C.DC. var. *solmsianum*, a qual foi catalogada com a numeração RB 368597.

#### 4.2.1 Obtenção do Extrato Metanólico

A folhas de *Piper solmsianum* fragmentadas e dessecadas (1,360 Kg) foram colocadas em um percolador de inox com tampa e submetidas ao processo de extração por maceração na presença de metanol como solvente extrator, durante 7 dias e a temperatura ambiente. Posteriormente, o extrato foi filtrado e concentrado até a completa eliminação do solvente, em evaporador rotatório sob pressão reduzida e banho-maria com temperatura controlada de 50° C durante todo o procedimento. Obteve-se 269,00 g do Extrato Metanólico Bruto, o qual foi mantido em dessecador com sílica ativada.

#### 4.2.2 Partição Líquido/Líquido

O extrato metanólico bruto foi submetido a sucessivas partições com eluentes: hexano, diclorometano (DCM) e acetato de etila (AE), seguindo a metodologia para investigação fitoquímica<sup>16</sup>. Posteriormente os extratos foram concentrados em rotavapor sob pressão reduzida até a completa eliminação do solvente. Obteve-se 45,17 g da fração hexano, 33,80 g da fração diclorometano, 7,80 g da fração acetato de etila e 182,23 g da fração hidroalcoólica (figura 9). Amostras do extrato metanólico e das frações: hexano, diclorometano e acetato de etila foram enviadas para testes biológicos.

#### 4.2.3 Esquema de Fracionamento do Extrato Metanólico

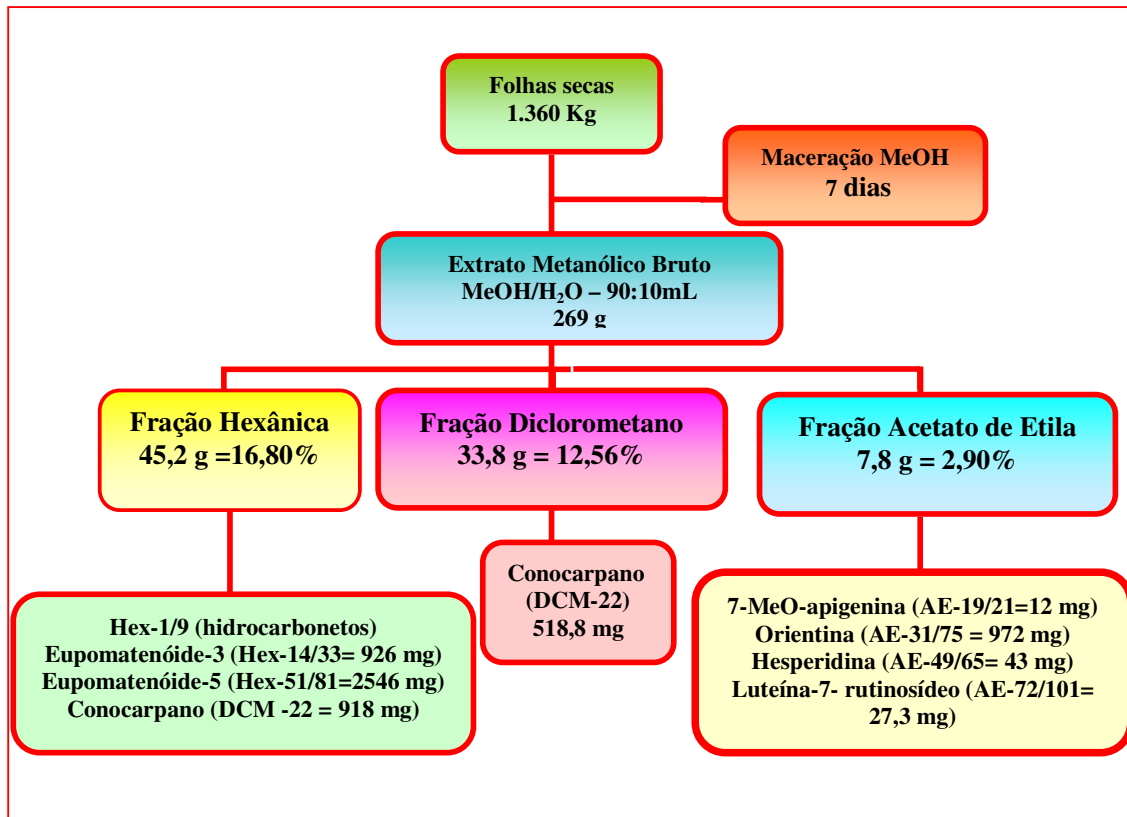


FIGURA 9 - Esquema de fracionamento do extrato metanólico bruto

#### 4.2.4 Separação dos Constituintes das Frações Obtidas

##### 4.2.4.1 Fração hexânica

A fração hexânica (37,3 g) foi submetida a uma coluna cromatográfica de 60 cm de comprimento por 5 cm de diâmetro, contendo 250 g de sílica-gel 60 de granulometria 70-230 *mesh* e empacotada com hexano. A eluição foi feita com gradiente crescente de polaridade: hexano, hexano/acetato de etila, acetato de etila e metanol, controlando-se a vazão em 30 gotas/min. Foram coletadas 120 frações, as quais foram monitoradas por cromatografia em camada delgada. As frações que

apresentaram perfil cromatográfico semelhantes, foram reunidas conforme tabela 11 demonstrada abaixo:

TABELA 11 – Sistema de eluição utilizado na separação dos compostos da fração hexânica

<i><b>FRAÇÕES</b></i>	<i><b>ELUENTE</b></i>	<i><b>FRAÇÃO EM ESTUDO</b></i>
1 – 9	Hexano	Hex – 1/9
10 – 13	Hexano	-
14 – 33	Hexano e Hexano (9)/ AE (1)	Hex - 14/33
34 – 50	Hexano (9)/AE(1)	-
51 – 81	Hexano (9)/AE(1) e Hexano (8)/ AE (2)	Hex – 51/81
82 – 100	Hexano (7)/AE (3) e Hexano (5)/AE (5)	-
101-120	Acetato de etila e etanol	-

#### 4.2.4.1.1 Tratamento da subfração Hex-1/9

A subfração Hex – 1/9 (930 mg) eluída com hexano, apresentou à formação de 265,7 mg de um precipitado semi-sólido amorfo e leitoso, o qual foi analisado por cromatografia em camada delgada e cromatografia gasosa. A cromatografia gasosa foi realizada nas seguintes condições: coluna capilar de sílica fundida de 30 m de comprimento e Hidrogênio (H<sub>2</sub>) como gás de arraste, programação linear com temperatura de 40°C a 305°C, velocidade de programação de 8°C/min, temperatura do injetor de 280°C, temperatura do detector de 310°C, com splitless e isoterma de 10 min. 5,0 mg da amostra foram diluídos para 1 mL de diclorometano, sendo injetado no cromatógrafo gasoso um volume de 1,0 µL. O cromatograma nos revelou que a subfração Hex-1/9 trata-se de uma mistura. Visando a elucidação da mistura Hex-1/9, a presente subfração foi submetida a análise por cromatografia gasosa acoplada a um espectrometro de massas.

#### 4.2.4.1.2 Tratamento da subfração Hex-14/33

A subfração Hex-14/33 (2.388 g) formou cristais incolores e alongados após a evaporação espontânea do solvente em meio a uma impureza com aspecto oleoso e de coloração amarela. Visando a sua purificação esta subfração foi submetida novamente

a uma coluna cromatográfica (CC) e eluída com gradiente crescente de polaridade: hexano, hexano/ acetato de etila, acetato de etila e etanol. Foram coletadas 45 subfrações, sendo que nos frascos 5 a 24, eluída com hexano e hexano/acetato de etila 9:1 precipitou 713,6 mg de cristais incolores e alongados, insolúveis em hexano e solúveis em diclorometano, os quais foram denominados de Hex-14/33. Estes cristais foram analisados por CCD e eluídos na fase móvel: hexano e acetato de etila 9:1. As cromatoplasmas foram submetidas à luz UV e observou-se fluorescência azul em 360 nm e roxa em 254 nm, que após revelação com anisaldeído sulfúrico e aquecimento, desenvolveu uma única mancha de coloração azul-acinzentada com  $R_f$  0,39. Posteriormente, estes cristais foram submetidos a uma cromatografia gasosa, utilizando-se uma coluna capilar de sílica fundida de 30m de comprimento e hidrogênio ( $H_2$ ) como gás de arraste, nas condições: programação linear com temperatura de 40°C a 305°C, velocidade de programação de 8°C/min, temperatura do injetor de 280°C, temperatura do detector de 310°C, com splitless e sem isoterma. 5,0 mg da amostra foram diluídos para 1 mL de diclorometano, sendo injetado no cromatógrafo gasoso um volume de 1,0  $\mu$ L.

Determinou-se o ponto de fusão do composto Hex-14/33, sendo que a temperatura inicial de fusão foi de 105°C e o término do processo ocorreu na temperatura de 107°C. Posteriormente, estes cristais foram submetidos às análises espectroscópicas de RMN  $^1H$ , RMN  $^{13}C$ / DEPT para a elucidação de sua estrutura química e enviados para testes biológicos.

#### 4.2.4.1.3 Tratamento da subfração Hex-51/81

A subfração Hex-51/81 (16,50 g) foi submetida a uma cromatografia em coluna e eluída com mistura de solventes de gradiente crescente de polaridade: hexano; hexano: acetato de etila; acetato de etila e etanol. Foram coletadas 76 subfrações. Durante a eluição com hexano e acetato de etila 9:1 nas subfrações 34 a 40 ocorreu a formação de 321mg de cristais incolores e alongados os quais foram denominados de Hex-51/81. O perfil fitoquímico destas subfrações foi determinado por cromatografia

em camada delgada utilizando-se a fase móvel hexano e acetato de etila 7:3. Verificamos que as cromatoplasmas apresentavam fluorescência arroxeada no UV-curto e ausência de fluorescência no UV-longo. Após a revelação com anisaldeído sulfúrico e aquecimento, ocorreu o desenvolvimento de uma única mancha de coloração azul-acinzentada com Rf 0,45. Esses cristais foram submetidos a uma cromatografia gasosa, utilizando-se uma coluna capilar de sílica fundida de 30 m de comprimento e H<sub>2</sub> como gás de arraste, nas condições: programação linear com temperatura de 40°C a 305°C, velocidade de programação de 8°C/min, temperatura do injetor de 280°C, temperatura do detector de 310°C, com splitless e sem isoterma. 5,0 mg da amostra foram diluídos para 1 mL de diclorometano, sendo injetado no cromatógrafo gasoso um volume de 1,0 µL. Posteriormente, foi submetido a análises espectroscópicas de IV, RMN<sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C/DEPT para a sua devida identificação química.

Nas subfrações 50 a 66 eluídas com hexano e acetato de etila 9:1 precipitaram 4,03 g de cristais incolores e alongados os quais foram analisados por CCD e observou-se após revelação apresentar uma única mancha azulada. Estes cristais foram analisados por cromatografia gasosa, nas condições acima citadas e verificou-se que é constituída por uma misturas de 3 compostos, os quais apresentam o mesmo Rf na CCD.

Visando a purificação da mistura de compostos das subfrações 50-66 acima mencionada, esta foi recromatografada em coluna cromatográfica de 60 cm de comprimento por 4 cm de diâmetro e empacotada com 120 g de sílica-gel 60 de granulometria 70-230 mesh e hexano. Como os compostos desta mistura têm o mesmo Rf em CCD, a coluna foi eluída com hexano 100 %, hexano 99 %: acetato de etila 1 % e hexano 98 %: acetato de etila 2 %, sendo que todo o processo de purificação foi acompanhado por cromatografia em camada delgada e as revelações foram comparadas com padrões dos compostos, Hex-14/33, Hex-51/81 e DCM-22 isolados em colunas anteriores. Nas subfrações 5 a 20 eluída com hexano, após a evaporação do solvente ocorreu a formação de 219 mg de cristais aciculares incolores, os quais foram analisados por CCD e comparado o Rf com os padrões acima mencionados. Nas subfrações 25 a 71 ocorreu a formação de 2270 mg destes cristais, os quais foram



denominados de Hex – 51/81. Ao serem analisados por CCD sob luz UV, observou-se que apresentam fluorescência roxa no comprimento de onda de 250 nm e não emitem fluorescência no comprimento de onda de 360 nm. Após nebulização com anisaldeído sulfúrico e aquecimento, ocorreu o desenvolvimento de uma única mancha de coloração azul-acinzentada com Rf 0,45. A revelação das subfrações 25-71 é semelhante a do padrão Hex-51/81, o qual sob luz UV emitem fluorescência roxa no comprimento de onda de 250 nm e fluorescência azul no comprimento de onda de 360 nm. Após nebulização com anisaldeído sulfúrico e aquecimento este composto revela uma mancha de coloração acastanhada. A partir da subfração 72 até a subfração 99 foram eluídas com a fase móvel hexano 99 % e acetato de etila 1 %, os cristais obtidos foram analisadas por CCD e os perfis cromatográficos foram semelhantes ao do padrão DCM-22. As subfrações 100 – 117 foram eluídas com hexano 98 % e acetato de etila 2 % e analisadas por CCD, sendo os perfis cromatográficos também semelhantes ao do padrão DCM-22. O esquema de fracionamento está demonstrado nas tabelas 12 e 13, abaixo:

TABELA 12 – Sistema de eluição utilizado na separação dos compostos da subfração Hex-51/81

<i>SUBFRAÇÕES</i>	<i>ELUIÇÃO</i>	<i>RF</i>	<i>LUZ UV 254 - 360 nm</i>		<i>ANISALDEÍDO SULFÚRICO</i>	<i>COMPOSTO</i>
1-33	Hexano, hexano (99):AE (1)	-	-	-	-	-
34 – 40	Hexano(98):AE(2)	0,45	Roxa	-	azul-acinzentada	Hex-51/81
41- 49	Hexano(98):AE(2)	-	-	-	-	-
50-66	Hexano(97):AE(3)	0,45	Roxa	Azul	Azulão	Mistura
67 -76	AE e etanol	-	-	-	-	-

TABELA 13 – Sistema de eluição utilizado na purificação da subfração Hex-51/81-50/66

<i>SUBFRAÇÕES</i>	<i>ELUIÇÃO</i>	<i>RF</i>	<i>FLUORESC.</i> <i>254 – 360 nm</i>		<i>ANISALDEÍDO</i> <i>SULFÚRICO</i>	<i>COMPOSTO</i>
1 – 4	Hexano 100%	-	-	-	-	-
5 – 20	Hexano 100%	0,45	Roxa	Azul	Azul acinzentada	Hex – 14/33
21 – 24	Hexano 100%	-	-	-	-	-
25 – 71	Hexano 100%	0,45	Roxa	-	Azul acinzentada	Hex-51/81
72 – 99	Hexano 99%: AE1%	0,45	Roxa	Azul	Tijolo	Hex-51/81- 72/99
100 – 117	Hexano 98%: AE2%	0,45	Roxa	Azul	Tijolo	DCM-22

Amostras destes 3 compostos foram enviadas para análise espectroscópica de RMN  $^1\text{H}$  e RMN  $^{13}\text{C}$  e assim, as suas respectivas identificações químicas.

#### 4.2.4.2 Fração diclorometano

Preparou-se uma pastilha contendo 2,5 g da fração DCM com 3 partes de sílica e submeteu-se a cromatografia de adsorção em coluna de 60 cm de altura por 2 cm de diâmetro, contendo 80 g de sílica-gel 60 de 70 - 230 *mesh*. A coluna foi eluída com mistura de solventes com gradiente de polaridade crescente: hexano; hexano/acetato de etila; acetato de etila; metanol. Regulou-se a vazão da coluna para 30 gotas por minuto.

Neste procedimento cromatográfico, foram coletadas 65 frações, as quais foram monitoradas por cromatografia em camada delgada e as frações que apresentaram perfil cromatográfico semelhante foram reunidas, segundo tabela 14, abaixo:

TABELA 14 – Sistema de eluição utilizado na separação dos compostos da fração diclorometano

<i>ELUENTE</i>	<i>SUBFRAÇÕES</i>	<i>RF</i>	<i>SUBFRAÇÃO EM ESTUDO</i>
Hexano e hexano/AE 9:1	1 – 15		-
Hexano/AE 8:2	16 – 18		-
Hexano/AE 8:2	19 – 21		Purificação
Hexano/AE 8:2	22	0,45	DCM – 22
Hexano/AE 7:3	23 – 30		-
Hexano/AE 5:5	31 – 49		-
Acetato de Etila	50 – 57		-
Metanol	58 – 65		-

#### 4.2.4.2.1 Tratamento da subfração DCM-19/21

A subfração DCM-19/21 (610 mg) foi recromatografada utilizando-se como fase móvel hexano, hexano / acetato de etila, acetato de etila e metanol em gradiente de polaridade, visando-se a purificação do composto DCM-22. Neste procedimento cromatográfico, utilizou-se como fase móvel hexano, acetato de etila e metanol em gradiente de polaridade, obtendo-se 376 mg de cristais esbranquiçados e alongados, os quais foram analisados por cromatografia em camada delgada e observou-se após revelação apresentar uma única mancha azulada. Estes cristais foram analisados por cromatografia gasosa, nas condições acima citadas e verificou-se que é constituída por uma mistura de 3 compostos, os quais apresentam o mesmo  $R_f$  na cromatografia em camada delgada, sendo que um deles é o DCM-22. Esta amostra foi então guardada em dessecador para nova tentativa de purificação quando da obtenção de maior quantidade dos compostos.

#### 4.2.4.2.2 Tratamento da subfração DCM-22

Na subfração DCM-22 após a evaporação espontânea do solvente ocorreu a formação de 142,8 mg de cristais esbranquiçados e alongados, os quais foram denominados de DCM-22 e analisados por cromatografia em camada delgada. A presente cromatoplaça após eluição em hexano/acetato de etila 7:3 foi submetida à luz UV-254 e 360 nm, observou-se uma fluorescência de coloração lilás arroxeada e azulão respectivamente que após revelação com anisaldeído sulfúrico e aquecimento, desenvolveu uma única mancha de coloração azul piscina com  $R_f$  0,44. Esses cristais foram submetidos a uma cromatografia gasosa nas condições citadas anteriormente (**p. 55**). O cromatograma apresentou apenas um pico com tempo de retenção de 28,12 segundos.

O ponto de fusão do composto DCM-22 é 136°C -137°C. Posteriormente, foi submetido à análise espectroscópicas de RMN  $^1\text{H}$  e RMN  $^{13}\text{C}$  para a elucidação de sua estrutura química.

#### 4.2.4.3 Fração acetato de etila

A fração acetato de etila (6,6 g) foi cromatografada em coluna de 60 cm de comprimento por 3,5 cm de diâmetro, contendo 150 g de sílica-gel 60 de 70 - 230 *mesh* como adsorvente e eluída com um gradiente crescente de polaridade: clorofórmio, clorofórmio/metanol e metanol, controlando-se a vazão em 30 gotas/min. Coletou-se 91 frações, as quais foram monitoradas por CCD e após análise do perfil cromatográfico, as frações similares foram reunidas, conforme tabela. 15 abaixo:

##### 4.2.4.3.1 Tratamento da subfração AE- 19/21

A subfração AE - 19/21 foi submetida a uma filtração com diclorometano. Após a evaporação do solvente, obteve-se 12,3 mg de um sólido de coloração amarela, o qual foi analisado por CCD, empregando-se o eluente: clorofórmio/metano 9:1 mL. Primeiramente, o perfil fitoquímico foi avaliado sob lâmpada de ultravioleta, observando-se uma única fluorescência roxa no comprimento de onda de 250 nm e não apresenta fluorescência no UV-360 nm. Posteriormente, foi revelada com anisaldeído sulfúrico, seguida de aquecimento, obtendo-se uma única mancha de coloração amarelada e com solução etanólica de cloreto férrico a 3 %, desenvolveu uma mancha de coloração marrom de Rf 0,52. Na seqüência, AE-19/21 foi submetido às análises espectroscópicas no IV, RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ /DEPT para a sua identificação química.

TABELA 15 – Sistema de eluição usado na separação de compostos da fração AE

<b>SUBFRAÇÕES</b>	<b>ELUENTE</b>	<b>SUBFRAÇÃO EM ESTUDO</b>
1-18	Clorofórmio e Clorofórmio(9)/MeOH (1)	-
19-21	Clorofórmio (9)/ MeOH (1)	AE – 19/21
22-25	Clorofórmio(9)/MeOH(1) e Clorofórmio(8)/MeOH(2)	-
26-27	Clorofórmio (8)/ MeOH (2)	-
28-30	Clorofórmio (8)/ MeOH (2)	-
31-75	Clorofórmio(7)/MeOH(3) e Clorofórmio(5)/MeOH(5)	AE – 31/75
76 – 91	MeOH	-

#### 4.2.4.3.2 Tratamento da subfração AE- 31/75

Para a eliminação das impurezas, a subfração AE-31/75 (3,5 g) foi submetida a uma filtração, utilizando-se uma mistura em partes iguais de acetato de etila e metanol. Após a evaporação do solvente, obteve-se 201,4 mg de um sólido de coloração amarela, o qual foi analisado por CCD. A cromatoplaça foi eluída na fase móvel acetato de etila: acetona: água: metanol 25:8:2:1 e usou-se como agente cromogênico, uma solução etanólica a 3 % de cloreto férrico, que revelou uma única mancha de coloração escura e de Rf 0,61. Na seqüência, este material foi enviado para análise espectroscópica no IV, RMN <sup>1</sup>H, RMN <sup>13</sup>C e DEPT para a elucidação de sua estrutura química. Amostras do composto AE- 31/75 foram enviadas para avaliação do seu potencial como agente antibacteriano, antifúngico e analgésico.

A água mãe obtida no processo de filtração acima descrito foi concentrada em rota – vapor para a eliminação do solvente e obteve-se 3,5 g de um sólido, o qual foi submetido a uma cromatografia em coluna aberta, para a separação dos seus constituintes. Utilizou-se neste processo de purificação, como eluente, um mistura dos solventes: acetato de etila/acetona e etanol 25:8:4 mL. Coletou-se 111 frações, as quais foram monitoradas por CCD e reveladas com solução etanólica a 3 % de cloreto férrico. Após a análise do perfil cromatográfico, as frações similares foram reunidas, como é demonstrado mostra na tabela. 16 abaixo.

TABELA 16 – Sistema de eluição utilizado na separação dos compostos da subfração AE- 31/75

FRAÇÕES	ELUENTE	Rf	FRAÇÃO EM ESTUDO
1- 17	AE/acetona/Et.OH 25:8:4 mL		-
18 – 48	Idem	0,61	AE-31/75
49 – 65		0,52	AE-49/65
72 – 101	Idem	0,51	AE-72/101
102 – 111	Idem	0,44	Purificação

Na subfração AE-18/48, precipitou 80 mg de um sólido amarelo, o qual foi analisado por CCD comparativa, usando-se padrão do AE-31/75. Após revelação com

solução etanólica de cloreto férrico a 3 % e comparando-se os Rfs, concluiu – se que o composto isolado é o AE-31/75.

#### 4.2.4.3.3 Tratamento da subfração AE- 49/65

Na subfração seguinte, AE- 49/65 precipitou um sólido amarelo escuro que foi analisado por cromatografia em camada delgada comparativa, com padrão de AE-31/75 e nebulização com cloreto férrico. Após análise do perfil cromatográfico, concluiu-se tratar de uma mistura de 2 flavonóides, sendo um deles o AE – 31/75, isolado anteriormente. Sendo assim, procedeu-se uma filtração desta subfração, visando a sua purificação, usando-se uma mistura em partes iguais dos solventes: acetato de etila e metanol. Desta forma, obteve-se após a secagem e análise por CCD, 727 mg do AE-31/75.

A subfração AE-49/65 (273 mg), também foi submetida a uma filtração, empregando-se uma mistura em partes iguais dos solventes: acetona e metanol. Após a evaporação do solvente, obteve-se 43 mg de um sólido amorfo de coloração amarelo claro, o qual foi analisado por CCD e nebulizado com anisaldeído sulfúrico sob aquecimento, ocorrendo o desenvolvimento de um mancha de coloração amarelo alaranjado. Aplicando-se na cromatoplaça o agente cromogênico, solução de cloreto férrico a 3 %, revelou uma mancha de coloração tijolo, com Rf 0,51. Este sólido AE-49/65 foi enviado para análise espectroscópica de RMN  $^1\text{H}$  e RMN  $^{13}\text{C}$ .

#### 4.2.4.3.4 Tratamento da subfração AE-72/101

A subfração AE-72/101, após avaliação do seu perfil cromatográfico por CCD e revelação com cloreto férrico a 3 %, verificou-se estar quase pura. Na sequência, visando a sua purificação, procedeu-se uma filtração, usando-se os solventes, acetato de etila e metanol 1:1. Após secagem, obteve-se 27,3 mg de um sólido acastanhado, o qual foi avaliado por CCD. A cromatoplaça foi eluída com a mistura de solventes: acetato de etila/acetona/água/metanol 25:8:2:1 mL e revelada com cloreto férrico a

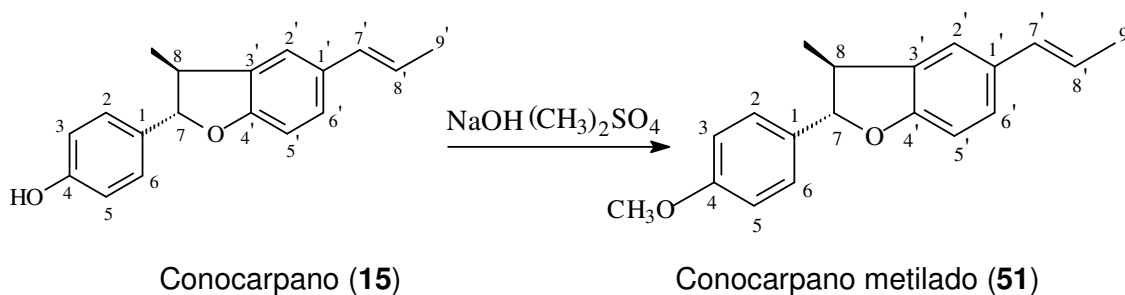
3%, formando de uma mancha escura de Rf 0,44. Este composto foi enviado para as análises espectroscópicas de RMN  $^1\text{H}$  e RMN  $^{13}\text{C}$ .

### 4.3 MODIFICAÇÕES ESTRUTURAIS

#### 4.3.1 Reação de Metilação

A metodologia usada foi similar à descrita por VOGEL (1985)<sup>91,135</sup>, com pequenas modificações.

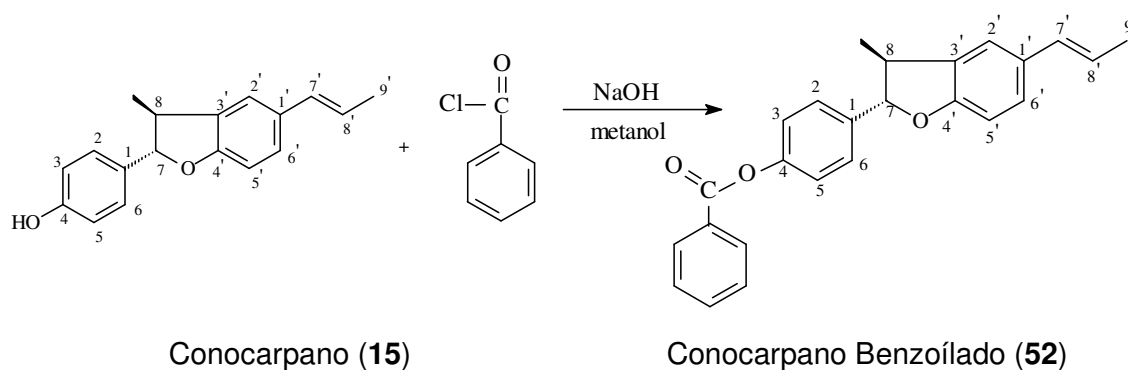
Foi colocado em um balão 0,263 mMol de conocarpano isolado de *Piper solmsianum*; 0,476 mMol de sulfato de dimetila; 0,05 mL de hidróxido de sódio 10 % e 3 mL de acetona foi deixada em repouso durante 24 horas. O produto de reação foi purificado por coluna cromatográfica (CC) empacotada com sílica gel e eluída com n-hexano, acetato de etila e etanol em gradientes de polaridades. O processo de purificação foi acompanhado por cromatografia em camada delgada, usando-se a fase móvel hexano: acetato de etila (8:2). As cromatoplasas foram reveladas em luz UV 256 – 360 nm e anisaldeído sulfúrico. Obteve-se 0,151 mMol do produto da reação, o qual foi denominado de ME-CON, com um rendimento de 57 %, solúvel em diclorometano e clorofórmio. A caracterização foi realizada por espectroscopia no IV, RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ .



#### 4.3.2 Reação de Benzoilação

A metodologia usada foi similar à descrita por VOGEL (1985)<sup>91,135</sup>, com pequenas modificações.

Em um balão foi adicionado 0,275 mMol de hidróxido de sódio; 1,5 mL de metanol e 0,263 mMol de conocarpano isolado de *Piper solmsianum* foi deixada sob agitação magnética por 5 minutos. Em seguida, adicionou-se 0,357 mMol de cloreto de benzoíla à mistura, a qual permaneceu por mais 15 minutos sob agitação. A reação foi acompanhada por CCD e o produto da reação foi posteriormente, transferido para um béquer contendo 6 mL de ácido clorídrico a 3 % e 2,0 g de gelo moído, ocorrendo à formação de um precipitado branco. O produto da reação foi transferido para um funil de separação, extraindo-se 3 x 10 mL de clorofórmio e seco com MgSO<sub>4</sub> anidro. A solução foi deixada à temperatura ambiente para a evaporação do solvente, ocorrendo à formação de um precipitado de coloração amarelo. O produto da reação foi purificado por cromatografia em coluna, usando-se como eluente hexano e acetato de etila com gradiente crescente de polaridade. O processo de purificação foi acompanhado por cromatografia em camada delgada, usando-se a fase móvel hexano: acetato de etila (8:2). As cromatoplasas foram reveladas em luz UV 256 nm e 360 nm e anisaldeído sulfúrico. Obteve-se 0,089 mMol do produto da reação, o qual foi denominado de BEN-CON, com um rendimento de 33,43%, solúvel em diclorometano e clorofórmio. A identificação foi por espectroscopia no IV, RMN <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C.

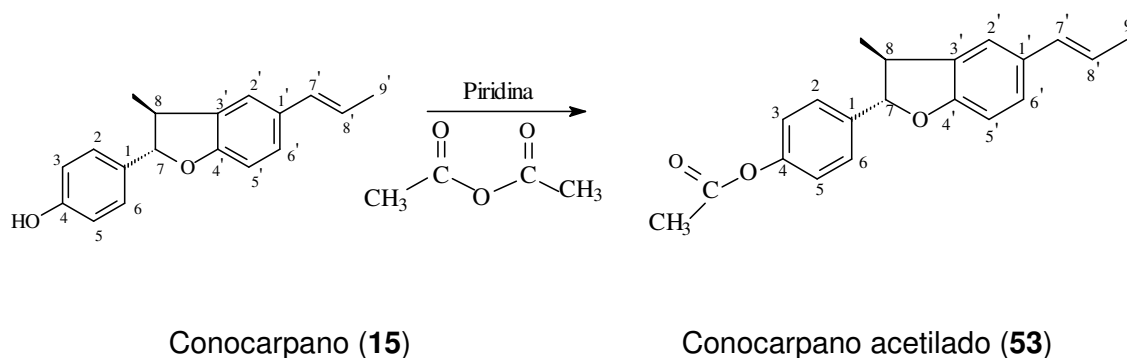


#### 4.3.3 Reação de Acetilação

A metodologia usada foi similar à descrita por VOGEL (1985)<sup>91,135</sup>, com pequenas modificações.



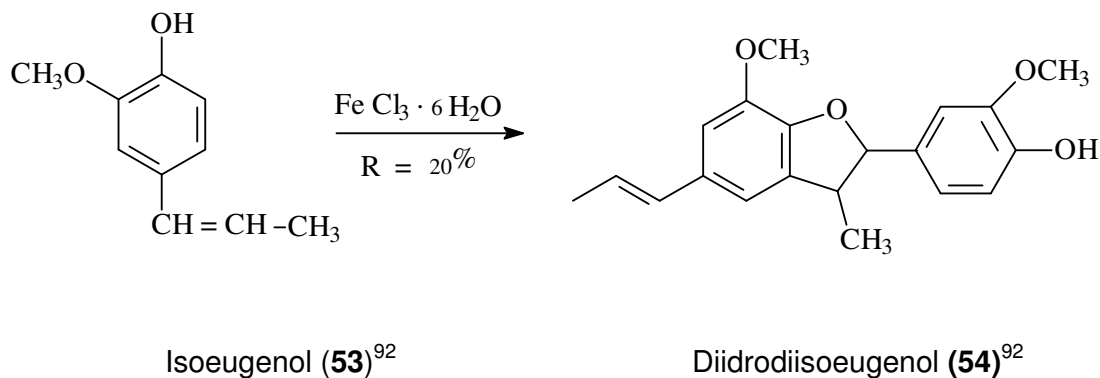
Em um balão foi adicionado 0,263 mMol de conocarpano isolado de *Piper solmsianum* dissolvido em 1,0 mL de piridina (Py) previamente seca com  $\text{MgSO}_4$  anidro e sob agitação foi adicionado 0,5 mL de anidrido acético. A mistura foi refluxada durante 5 minutos e a reação foi acompanhada por CCD. Na seqüência, transferiu-se a reação para um béquer contendo 5 mL de água destilada gelada, ocorrendo a formação imediata de um precipitado branco, o qual foi colocado num funil de separação e extraiu-se com 3 x 10 mL de clorofórmio e posteriormente, seco com  $\text{MgSO}_4$  anidro. A solução foi filtrada e após alguns dias, houve a precipitação de cristais brancos, os quais foram analisados por CCD para verificar-se a sua pureza. O produto da reação foi purificado por cromatografia em coluna e eluída com hexano: acetato de etila com gradiente crescente de polaridade. Obteve-se 0,101 mMol do produto da reação, o qual foi denominado de ACE-CON, com um rendimento 38,27 % solúvel em diclorometano e clorofórmio. A caracterização foi por espectroscopia no IV, RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ .



#### 4.3.4 Síntese do Diidrodiisoeugenol

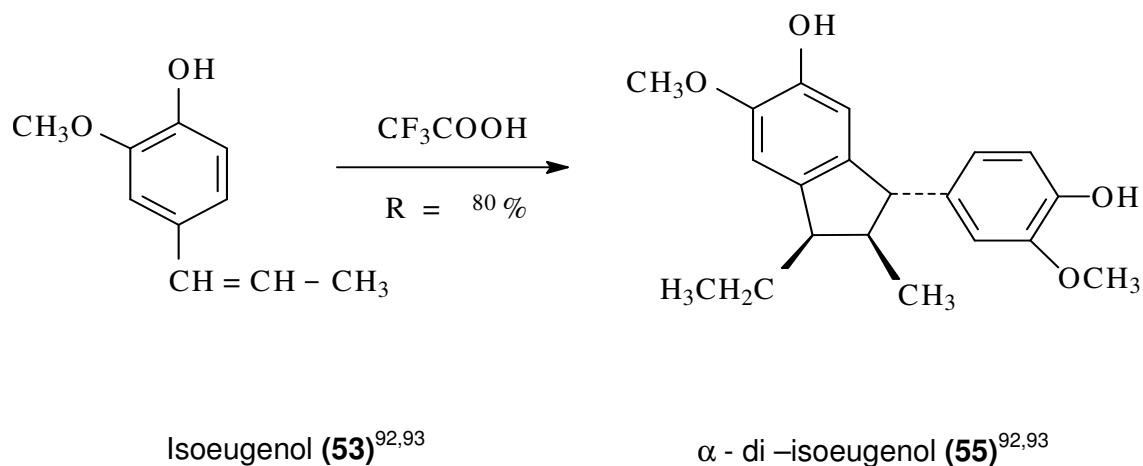
Uma solução com 20 mL de isoeugenol e 118,45 mMol de  $\text{FeCl}_3 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$  foi dissolvida em 1200 mL de acetona a 30 % e mantida em agitação sob uma atmosfera de nitrogênio a temperatura de  $20^\circ\text{C}$  por 7 dias. Decorrido este tempo, a acetona foi retirada em rota vapor sob pressão reduzida. O material orgânico foi purificado por cromatografia em coluna, com sílica-gel 60 e eluída em gradiente crescente de

polaridade hexano:acetato de etila, obtendo-se um sólido amorfo de coloração esbranquiçada, o qual foi submetido a análise espectroscópica de RMN  $^1\text{H}$ <sup>92</sup>.



#### 4.3.5 Síntese do $\alpha$ -Di-Isoeugenol<sup>92,93</sup>

Foi adicionada 12,27 mMol de isoeugenol a uma solução de ácido trifluoroacético (6 mL) em clorofórmio (24 mL) resultando numa solução avermelhada brilhante. O solvente foi eliminado por rota vapor sob pressão reduzida. Obteve-se um sólido amorfo esbranquiçado, o qual foi denominado de  $\alpha$ -di-isoeugenol, solúvel em diclorometano e clorofórmio. A caracterização foi por espectroscopia no IV, RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ .



#### 4.4 DADOS ESPECTROSCÓPICOS DOS COMPOSTOS ISOLADOS, DOS SEUS DERIVADOS E PRODUTOS DE SÍNTESE

##### 4.4.1 Composto Hex-14/33 (Eupomatenóide-3) isolado da Fração Hexânica

Fórmula molecular:  $[C_{19}H_{16}O_3]$

Ponto de Fusão (P.F.) = 105 - 107°C

RMN  $^1H$  (300 MHz,  $CDCl_3$ , TMS) 1,92 [ $C_9'$ (dd,  $J = 1,5$  e 6,5 Hz)], 2,42 [ $C_9$ (s)], 6,01 [(s)], 6,23 [ $C_8'$ (dd,  $J = 15,7$  Hz)], 6,51 [ $C_7'$ (dd,  $J = 6,6$  e 15,6 Hz)], 6,92 [ $C_5$ (d,  $J = 8,6$  Hz)], 7,26 [ $C_2$  e  $C_6'$ (m)], 7,27 [ $C_6$ (m)], 7,36 [ $C_5'$ (d,  $J = 8,5$  Hz)], 7,42 [ $C_2'$ (s)].

RMN  $^{13}C$  (75,5 MHz,  $CDCl_3$ , TMS) 9,47 [ $C_9$ ( $CH_3$ )], 18,51 [ $C_9'$ ( $CH_3$ )], 101,24 [ $OCH_2O$ ], 107,13 [ $C_2$ (CH)], 108,56 [ $C_5$ (CH)], 110,14 [ $C_8$ (C)], 110,65 [ $C_5'$ (CH)], 116,13 [ $C_2'$ (CH)], 120,86 [ $C_6$ (CH)], 122,32 [ $C_6'$ (CH)], 124,24 [ $C_8'$ (CH)], 125,48 [ $C_1$ (C)], 131,20 [ $C_7'$ (CH)], 131,42 [ $C_3'$ (C)], 132,66 [ $C_1'$ (C)], 147,33 [ $C_3$ (C)], 147,89 [ $C_4$ (C)], 150,93 [ $C_7$ (C)], 152,84 [ $C_4'$ (C)].

##### 4.4.2 Composto Hex-51/81 (Eupomatenóide-5) isolado da Fração Hexânica

Fórmula molecular -  $[C_{19}H_{18}O_3]$

Ponto de Fusão (P.F.) = 113 – 114°C

RMN  $^1H$  (300 MHz,  $CDCl_3$ , TMS) 1,90 [ $C_9'$ (dd,  $J = 1,5$  e 6,5 Hz)], 2,43 [ $C_9$ (s)], 3,98 [s], 5,75 [ $C_4$ (s)], 6,23 [ $C_8'$ (dd,  $J = 6,5$  e 15,7 Hz)], 6,52 [ $C_7'$ (dd,  $J = 1,5$  e 15,7 Hz)], 7,01 [ $C_5$ (d,  $J = 8,2$  Hz)], 7,26 [ $C_2'$ (s)], 7,28 [ $C_6'$ (dd,  $J = 3,0$  e 5,0 Hz)], 7,31 [ $C_5'$ (m)], 7,37 [ $C_6$ (d,  $J = 8,31$  Hz)], 7,43 [ $C_2$ (d,  $J = 1,4$  Hz)].

RMN  $^{13}C$  (75,5 MHz,  $CDCl_3$ , TMS) 9,45 [ $C_9$ ( $CH_3$ )], 18,51 [ $C_9'$ ( $CH_3$ )], 56,02 [ $OCH_3$ ], 109,14 [ $C_2$ (CH)], 109,81 [ $C_8$ (C)], 110,58 [ $C_5'$ (CH)], 114,50 [ $C_5$ (CH)], 116,08 [ $C_2'$ (CH)], 120,36 [ $C_6$ (CH)], 122,17 [ $C_6'$ (CH)], 123,82 [ $C_1$ (CH)], 124,21 [ $C_8'$ (CH)], 131,21 [ $C_7'$ (CH)], 131,50 [ $C_3'$ (CH)], 132,62 [ $C_1'$ (CH)], 145,63 [ $C_4$ (C)], 146,61 [ $C_3$ (C)], 151,20 [ $C_7$ (C)], 152,83 [ $C_4'$ (C)].

#### 4.4.3 Composto DCM-22 (Conocarpano) isolado da Fração Hexânica e Diclorometano

Fórmula molecular:  $C_{18}H_{18}O_2$

Ponto de fusão (P.F.):  $131^{\circ}C - 133^{\circ}C$

RMN  $^1H$  (300 MHz,  $CDCl_3$ , TMS) 1,38 [ $C_9$  (d,  $J = 6,8$  Hz)], 1,84 [ $C_9'$  (dd,  $J = 1,6-6,6$  Hz)], 3,38 [ $C_8$  (m)], 5,07 [ $C_7$  (d,  $J = 8,9$  Hz)], 6,09 [ $C_8'$  (dd,  $J = 6,6 - 15,7$  Hz)], 6,36 [ $C_7'$  (dd,  $J = 1,6 - 15,7$  Hz)], 6,80 [ $C_3$  e  $C_5$  (d,  $J = 8,6$  Hz)], 6,76 [ $C_5'$  (d,  $J = 8,4$  Hz)], 7,10 [ $C_6'$  (d,  $J = 1,68$  Hz)], 7,13 [ $C_2'$  (s)], 7,28 [ $C_2$  e  $C_6$  (d,  $J = 8,5$  Hz)].

RMN  $^{13}C$  (75,5 MHz,  $CDCl_3$ , TMS): 17,76 [ $C_9(CH_3)$ ], 18,39 [ $C_9'(CH_3)$ ], 45,13 [ $C_8$  (CH)], 92,63 [ $C_7$  (CH)], 109,26 [ $C_5'$  (CH)], 115,40 [ $C_3$  (CH)], 115,44 [ $C_5$  (CH)], 120,70 [ $C_2'$  (CH)], 123,06 [ $C_8'$  (CH)], 126,27 [ $C_6'$  (CH)], 127,86 [ $C_2$  e  $C_6$  (CH)], 130,69 [ $C_7'$  (CH)], 131,27 [ $C_1$  (C)], 132,32 [ $C_1'$  (C)], 132,69 [ $C_3'$  (C)], 155,60 [ $C_4$  (C)], 158,12 [ $C_4'$  (C)].

#### 4.4.4 Composto AE – 19/21 (7- metoxi-apigenina) isolado da Fração Acetato de Etila

Fórmula molecular –  $C_{16}H_{12}O_5$

IV  $\nu_{max}$   $cm^{-1}$  (KBr): 3261 ( $\nu_{O-H}$ ), 1667 (C = O), 1606, 1590, 1501 ( $\nu_{C-C}$ ), 1376, 1341, 1292, 1246, 1223, 1209, 1191, 1180 ( $\delta_{C-H}$ ), 1161 ( $\nu_{C-O-C}$ ), 831 ( $\delta_{C-H}$ ).

RMN  $^1H$  (300 MHz,  $C_5D_5N$ , TMS): 3,78 [(s)], 6,36 [ $C_6$  (d,  $J = 1,8$  Hz)], 6,66 [ $C_3$  (s)], 6,81 [ $C_8$  (d,  $J = 2,1$  Hz)], 6,94 [ $C_3'$  e  $C_5'$  (d,  $J = 8,7$  Hz)], 7,58 [ $C_4'$  (s)], 7,90 [ $C_2'$  e  $C_6'$  (d,  $J = 8,8$  Hz)], 8,74 [ $C_5$  (s)].

RMN  $^{13}C$  (75,5 MHz,  $C_5D_5N$ , TMS): 55,7 [ $OCH_3$ ], 92,8 [ $C_8$  (CH)], 98,30 [ $C_6$  (CH)], 103,8 [ $C_3$  e  $C_{10}$  (CH)], 116,7 [ $C_3'$  e  $C_5'$  (CH)], 121,9 [ $C_1'$  (C)], 128,7 [ $C_2'$  e  $C_6'$  (CH)], 157,80 [ $C_9$  (C)], 162,6 [ $C_4'$  (C)], 164,6 [ $C_2$  (C)], 165,6 [ $C_7$  (C)].

#### 4.4.5 Composto AE-31/75 (Orientina) isolado da Fração Acetato de Etila

Fórmula molecular:  $C_{21}H_{20}O_{11}$

IV  $\nu_{\max}$   $\text{cm}^{-1}$  (KBr): 3514, 3379, 3313, 3208 ( $\nu_{\text{O-H}}$ ), 2923 ( $\nu_{\text{asC-H}}$ ), 2826 ( $\nu_{\text{sC-H}}$ ), 1655 (C = O), 1612, 1576, 1551 e 1511 ( $\nu_{\text{C-C}}$ ), 1291, 1248, 1192 e 1105 ( $\delta_{\text{C-H}}$ ), 847 ( $\delta_{\text{C-H}}$ ).

RMN  $^1\text{H}$  (300 MHz, DMSO- $d_6$ , TM/S): 3,27 [ $\text{C}_3''$ (m)], 3,36 [ $\text{C}_6''$ (m)], 3,55 [ $\text{C}_4''$ (m)], 3,79 [ $\text{C}_5''$ (m)], 4,68 [ $\text{C}_1''$ (d,  $J = 10,0\text{Hz}$ )], 6,26 [ $\text{C}_6$ (s)], 6,64 [ $\text{C}_3$ (s)], 6,65 [ $\text{C}_3'$ (C), s], 6,87 [ $\text{C}_5'$ (d,  $J = 8,1\text{Hz}$ )], 7,53 [ $\text{C}_6'$ (d,  $J = 7,39\text{ Hz}$ )], 7,48 [ $\text{C}_2'$ (d)], 13,17 [ $\text{C}_5$ (s)].

RMN  $^{13}\text{C}$  (75,5 MHz, DMSO- $d_6$ , TMS): 61,81 [ $\text{C}_6''$ ( $\text{CH}_2\text{OH}$ )], 70,87 [ $\text{C}_4''$ (C)], 70,94 [ $\text{C}_2''$ (C)], 73,57 [ $\text{C}_1''$ (CH)], 78,84 [ $\text{C}_3''$ (C)], 82,18 [ $\text{C}_5''$ (C)], 98,32 [ $\text{C}_6$ (CH)], 102,57 [ $\text{C}_3$ (CH)], 104,16 [ $\text{C}_{10}$ (C)], 104,73 [ $\text{C}_8$ (C)], 114,23 [ $\text{C}_2'$ (CH)], 115,81 [ $\text{C}_5'$ (CH)], 118,83 [ $\text{C}_6'$ (CH)], 122,14 [ $\text{C}_1'$ (C)], 145,88 [ $\text{C}_3'$ (C)], 148,85 [ $\text{C}_4'$ (C)], 156,18 [ $\text{C}_9$ (C)], 160,56 [ $\text{C}_5$ (C)], 162,85 [ $\text{C}_7$ (C)], 164,24 [ $\text{C}_2$ (C)], 182,18 [ $\text{C}_4$ (C)].

#### 4.4.6 Composto AE - 49/65 (Hesperidina) isolado da Fração Acetato de Etila

Fórmula molecular:  $\text{C}_{28}\text{H}_{34}\text{O}_{15}$

IV  $\nu_{\max}$   $\text{cm}^{-1}$  (KBr): 3389 (OH), 2930 ( $\text{CH}_3$ ), 2871 ( $\text{CH}_3$ ), 1642 (C = O), 1067 (C-O).

RMN  $^1\text{H}$  (300 MHz,  $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ , TMS): 1,58 [ $\text{C}_6'''$ (d,  $J = 5,4\text{ Hz}$ )], 2,83 [ $\text{C}_3$ (dd,  $J = 3,0$  e  $17,00\text{ Hz}$ )], 3,74 [ $\text{C}_3'$ (s)], 4,75 [ $\text{C}_2''$ ,  $\text{C}_3''$ ,  $\text{C}_4''$ ,  $\text{C}_5''$  e  $\text{C}_6''$ ,  $\text{C}_2'''$ ,  $\text{C}_3'''$ ,  $\text{C}_4'''$  e  $\text{C}_5'''$ (m)], 5,49 [ $\text{C}_1''$  e  $\text{C}_2$ (dd,  $J = 3,1 - 12,2\text{ Hz}$ )], 5,64 [ $\text{C}_1'$ (d,  $J = 7,38\text{ Hz}$ )], 6,51 [ $\text{C}_8$ (d,  $J = 2,0\text{Hz}$ )], 6,62 [ $\text{C}_6$ (d,  $J = 2,0\text{ Hz}$ )], 6,99 [ $\text{C}_5'$ (s)], 7,12 [ $\text{C}_6'$ (dd)], 7,53 [ $\text{C}_2'$ (d,  $J = 1,95\text{ Hz}$ )], 7,58 [ $\text{C}_3'$ (s)], 8,78 [ $\text{C}_5$ (s)].

RMN  $^{13}\text{C}$  (75,5 MHz,  $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ , TMS): 18,37 [ $\text{C}_6'''$ ( $\text{CH}_3\text{-Rha}$ )], 42,90 [ $\text{C}_3$ (CH)], 55,64 [( $\text{OCH}_3$ )], 67,12 [ $\text{C}_6''$ ( $\text{CH}_2$ )], 69,57 [ $\text{C}_4''$ (CH)], 71,02 [ $\text{C}_2'''$ (CH)], 71,86 [ $\text{C}_3'''$ (CH)], 72,53 [ $\text{C}_4'''$ (CH)], 73,84 [ $\text{C}_5'''$ (CH)], 74,33 [ $\text{C}_2''$ (CH)], 77,28 [ $\text{C}_5''$ (CH)], 78,19 [ $\text{C}_3''$ (CH)], 79,25 [ $\text{C}_2$ (CH)], 96,16 [ $\text{C}_8$ (CH)], 97,46 [ $\text{C}_6$ (CH)], 101,28 [ $\text{C}_1''$ (CH-Gluc)], 102,27 [ $\text{C}_1'''$ (CH-Rha)], 104,10 [ $\text{C}_{10}$ (CH)], 112,03

[C<sub>5</sub>'(CH)], 115,07[C<sub>2</sub>'(CH)], 117,87 [C<sub>6</sub>'(CH)], 131,88 [C<sub>1</sub>'(C)], 148,17 [C<sub>3</sub>'(CH)], 148,86 [C<sub>4</sub>'(CH)], 163,23 [C<sub>5</sub>(C)], 164,23 [C<sub>9</sub>(C)], 166,20 [C<sub>7</sub>(C)], 196,83 [C<sub>4</sub>(C)].

#### 4.4.7 Composto AE-72/101 (Luteolina-7-rutinosídeo) isolado da Fração Acetato de Etila

Fórmula molecular: C<sub>27</sub>H<sub>30</sub>O<sub>15</sub>

RMN <sup>1</sup>H (200 MHz, CD<sub>3</sub>OD, TMS): 1,18 [C<sub>6</sub>'''(d, *J* = 6,0Hz)], 3,34-3,91 [C<sub>2</sub>'', C<sub>3</sub>'', C<sub>4</sub>'', C<sub>5</sub>'', C<sub>6</sub>'', C<sub>2</sub>''', C<sub>3</sub>''', C<sub>4</sub>'''(m)], 4,05 [C<sub>5</sub>'''(d, *J* = 9,4 Hz)], 4,72 [C<sub>1</sub>'''(d)], 5,02 [C<sub>1</sub>''(d)], 6,51[C<sub>8</sub>(d)], 6,58 [C<sub>6</sub>(d)], 6,72 [C<sub>3</sub>(s)], 6,91 [C<sub>5</sub>'(d, *J* = 10,4 Hz)], 7,40 [C<sub>2</sub>'(d)] e 7,41 [C<sub>6</sub>'(d)]

RMN <sup>13</sup>C (50 MHz, CD<sub>3</sub>OD, TMS): 17,94 [C<sub>6</sub>'''(CH<sub>3</sub>)], 67,53 [C<sub>5</sub>'''(CH)], 69,84 [C<sub>4</sub>'' e C<sub>6</sub>''(CH)], 71,37 [C<sub>3</sub>'''(CH)], 72,11 [C<sub>2</sub>'''(CH)], 72,46 [C<sub>4</sub>'''(CH)], 74,78 [C<sub>2</sub>'' e C<sub>5</sub>''(CH)], 77,19 [C<sub>3</sub>''(CH)], 77,84 [C<sub>5</sub>'(CH)], 96,16[C<sub>6</sub>(CH)], 101,16 [C<sub>6</sub>(CH)], 101,64 [C<sub>1</sub>'''(CH)], 102,14 [C<sub>1</sub>''(CH)], 104,27 [C<sub>10</sub>(CH)], 104,28 [C<sub>3</sub>(CH)], 107,14 [C<sub>10</sub>(CH)], 114,34 [C<sub>2</sub>'(CH)], 116,92 [C<sub>5</sub>'(CH)], 120,65 [C<sub>1</sub>'(CH)], 123,53 [C<sub>6</sub>'(C)], 147,04 [C<sub>3</sub>'(C)], 151,24 [C<sub>4</sub>'(C)], 158,92 [C<sub>9</sub>(C)], 162,97 [C<sub>5</sub>(C)], 164,76 [C<sub>7</sub>(C)], 166,97 [C<sub>2</sub>(C)], 184,03 [C<sub>4</sub>(C)].

#### 4.4.8 Composto ME-CON ( Conocarpano metilado)

Fórmula molecular: [C<sub>19</sub>H<sub>21</sub>O<sub>3</sub>].

IV  $\nu_{\max}$  cm<sup>-1</sup> (KBr): 2959 ( $\nu_{\text{as}}\text{CH}_3$ ), 2928 ( $\nu_{\text{as}}\text{CH}_3$ ), 2882 ( $\nu_{\text{s}}\text{CH}_3$ ), 2853 ( $\nu_{\text{s}}\text{CH}_3$ ), 1729, 1610 (C = C, aromático) 1514, 1482 (C = C, aromático), 1453 ( $\delta_{\text{as C-H}} \text{CH}_3$ ), 1376 ( $\delta_{\text{s C-H}} \text{CH}_3$ ), 1337, 1301, 1257 ( $\nu_{\text{as}} \text{C} - \text{O} - \text{C}$ ), 1240, 1202, 1173, 1114, 1098, 1033 ( $\nu_{\text{s}} \text{C} - \text{O} - \text{C}$ ), 961, 934, 823 ( $\delta_{\text{C-H}} \text{ aromático}$ ) , 811( $\delta_{\text{C-H}} \text{ aromático}$ ), 793( $\delta_{\text{C-H}} \text{ aromático}$ ), 722, 704, 592, 541, 504, 440.

RMN <sup>1</sup>H (200 MHz, CDCl<sub>3</sub>, TMS)  $\delta$ : 1,40 [C<sub>9</sub>(d, *J* = 6,80 Hz)], 1,87 [C<sub>9</sub>'(d, *J* = 6,3 Hz)], 3,42[C<sub>8</sub>(m)], 3,82 [OCH<sub>3</sub>(s)], 5,10 [C<sub>7</sub>(d, *J* = 8,8 Hz)], 6,09 [C<sub>8</sub>'(m)]; 6,38 [C<sub>7</sub>'(d, *J* = 15,8 Hz)]; 6,78 [C<sub>5</sub>'(d, *J* = 8,6 Hz)]; 6,92 [C<sub>3</sub> e C<sub>5</sub>(d, *J* = 8,6 Hz)]; 7,13 [C<sub>2</sub>' e C<sub>6</sub>'(d, *J* = 7,42 Hz)]; 7,36 [C<sub>2</sub> e C<sub>6</sub>(d, *J* = 8,6 Hz)].

RMN  $^{13}\text{C}$  (50 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , TMS): 17,8 ( $\text{C}_9$ ), 18,4 ( $\text{C}_9'$ ), 45,2 ( $\text{C}_8$ ), 55,3 ( $\text{OCH}_3$ ), 92,6 ( $\text{C}_7$ ), 109,2 ( $\text{C}_5'$ ), 114,0 ( $\text{C}_3$  e  $\text{C}_5$ ), 120 ( $\text{C}_2'$ ), 122,9 ( $\text{C}_8'$ ), 126,2 ( $\text{C}_6'$ ), 127,6 ( $\text{C}_2$  e  $\text{C}_6$ ), 130,7 ( $\text{C}_7'$ ), 131,2 ( $\text{C}_1$ ), 132,4 ( $\text{C}_1'$ ), 132,6 ( $\text{C}_3'$ ), 158,3 ( $\text{C}_4$  e  $\text{C}_4'$ ).

#### 4.4.9 Composto BEN-CON (Conocarpano benzoilado)

Fórmula molecular:  $[\text{C}_{25}\text{H}_{23}\text{O}_4]$ .

IV  $\nu_{\text{max}}$   $\text{cm}^{-1}$  (KBr): 2.959 ( $\nu_{\text{ass}}$  C–H  $\text{CH}_3$ ), 2.922 ( $\nu_{\text{ass}}$  C–H  $\text{CH}_3$ ); 2.873 ( $\nu_{\text{s}}$  C–H  $\text{CH}_3$ ); 1.734 ( $\text{C}=\text{O}$ ); 1.607 ( $\text{C}=\text{C}$  aromático); 1.594 ( $\text{C}=\text{C}$  aromático); 1.478 ( $\delta_{\text{ass}}$   $\text{CH}_3$ ); 1.449 ( $\delta_{\text{ass}}$   $\text{CH}_3$ ); 1.377 ( $\delta_{\text{s}}$   $\text{CH}_3$ ); 1.251 ( $\nu$  C–O); 1.232 ( $\nu$  C–O); 1.196 ( $\nu_{\text{ass}}$  C–C(=O)–O de acetato); 1.165 (C–O éter); 1.078 ( $\nu_{\text{ass}}$  C–O–C); 1.020 ( $\nu_{\text{ass}}$  C–O–C); 972 ( $\delta$  C–H do anel); 715 ( $\delta$  C–H do anel).

RMN  $^1\text{H}$  (200 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , TMS): 1,46 [ $\text{C}_9$  (d,  $J = 6,74$  Hz)], 1,88 [ $\text{C}_9'$  (d,  $J = 6,38$  Hz)], 3,45 [ $\text{C}_8$  (m)], 5,20 [ $\text{C}_7$  (d,  $J = 8,54$  Hz)], 6,15 [ $\text{C}_8'$  (m)], 6,39 [ $\text{C}_7'$  (d,  $J = 15,8$  Hz)], 6,81 [ $\text{C}_5'$  (d,  $J = 8,62$  Hz)], 7,15 [ $\text{C}_2'$  e  $\text{C}_6'$  (d,  $J = 6,67$  Hz)], 7,25 [ $\text{C}_2$  e  $\text{C}_6$  (d,  $J = 6,67$  Hz)], 7,51 [ $\text{C}_3$  e  $\text{C}_5$  (d,  $J = 7,88$  Hz)], 7,59 [ $\text{C}_3''$ ,  $\text{C}_4''$ ,  $\text{C}_5''$  e  $\text{C}_6''$  (m)], 7,68 [ $\text{C}_3''$  (d,  $J = 7,13$  Hz)], 8,23 [ $\text{C}_2''$  (d,  $J = 7,51$  Hz)].

RMN  $^{13}\text{C}$  (50 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , TMS): 18,09 ( $\text{C}_9$ ), 18,33 ( $\text{C}_9'$ ), 45,33 ( $\text{C}_8$ ), 92,09 ( $\text{C}_7$ ), 109,28 ( $\text{C}_5'$ ), 120,76 ( $\text{C}_2'$ ), 121,88 ( $\text{C}_3$  e  $\text{C}_5$ ), 123,12 ( $\text{C}_8'$ ), 126,33 ( $\text{C}_6'$ ), 127,20 ( $\text{C}_2$  e  $\text{C}_6$ ), 128,56 ( $\text{C}_3''$  e  $\text{C}_5''$ ), 129,42 ( $\text{C}_6'$ ), 130,67 ( $\text{C}_2''$  e  $\text{C}_4''$ ), 131,41 ( $\text{C}_1$ ), 132,06 ( $\text{C}_1'$ ), 133,63 ( $\text{C}_3'$ ), 138,43 ( $\text{C}_1''$ ), 150,76 ( $\text{C}_4$ ), 158,23 ( $\text{C}_4'$ ), 165,10 (O–C=O);

#### 4.4.10 Composto ACE-CON (Conocarpano acetilado)

Fórmula molecular:  $[\text{C}_{20}\text{H}_{21}\text{O}_4]$

IV  $\nu_{\text{max}}$   $\text{cm}^{-1}$  (KBr): 3.021 ( $\nu$  C–H aromático), 2.962 ( $\nu_{\text{ass}}$  C–H  $\text{CH}_3$ ), 2.926 ( $\nu_{\text{ass}}$  C–H  $\text{CH}_3$ ), 2.878 ( $\nu_{\text{s}}$  C–H  $\text{CH}_3$ ), 1.765 ( $\text{C}=\text{O}$  carbonila), 1.609 ( $\nu$  C=C aromático), 1.485 ( $\delta_{\text{ass}}$   $\text{CH}_3$ ), 1.369 ( $\delta_{\text{s}}$   $\text{CH}_3$ ), 1.195 ( $\nu$  C–C(=O)–O acetato), 967 ( $\delta$  C–H do anel).

RMN  $^1\text{H}$  (200 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , TMS): 1,42 [ $\text{C}_9$  (d,  $J = 6,73$  Hz)], 1,86 [ $\text{C}_9'$  (d,  $J = 6,31$  Hz)], 2,30 [ $\text{CH}_3$  (s)], 3,40 [ $\text{C}_8$  (m)], 5,14 [ $\text{C}_7$  (d,  $J = 8,48$  Hz)], 6,10 [ $\text{C}_8'$  (m)], 6,37

[C<sub>7</sub>' (d,  $J = 15,79\text{Hz}$ )], 6,78 [C<sub>5</sub>' (d,  $J = 8,68\text{ Hz}$ )], 7,07 [C<sub>2</sub>' (s)], 7,13 [C<sub>2</sub> e C<sub>6</sub> (d,  $J = 4,26\text{ Hz}$ )], 7,14 [C<sub>6</sub>' (s)], 7,42 [C<sub>3</sub> e C<sub>5</sub> (d,  $J = 8,28\text{ Hz}$ )].

RMN <sup>13</sup>C (200 MHz, CDCl<sub>3</sub>, TMS): 14,09 [(CH<sub>3</sub>)], 14,33 [(CH<sub>3</sub>)], 17,07 [(CH<sub>3</sub>)], 41,43 [C<sub>8</sub> (CH)], 88,00 [C<sub>7</sub> (CH)], 105,23 [C<sub>5</sub>' (CH)], 117,69 [C<sub>2</sub> (CH) e C<sub>6</sub> (CH)], 119,07 [C<sub>8</sub>' (CH)], 122,29 [C<sub>6</sub>' (CH) e C<sub>8</sub>' (CH)], 123,10 [C<sub>3</sub> (CH) e C<sub>5</sub> (CH)], 126,63 [C<sub>7</sub>' (CH)], 127,36 [C<sub>1</sub>' (C)], 127,99 [C<sub>1</sub>' (C)], 134,4 [C<sub>1</sub> (C)], 146,44 [C<sub>4</sub> (C)], 154,16 [C<sub>4</sub>' (C)], 165,36 [(C=O)].

#### 4.4.11 Composto DHDISO (Diidrodiisoeugenol)

Fórmula molecular: C<sub>20</sub>H<sub>22</sub>O<sub>4</sub>

RMN <sup>1</sup>H (200 MHz, CD<sub>3</sub>OD, TMS): 1,38 [C<sub>9</sub> (d,  $J = 5,82\text{ Hz}$ )], 1,87 [C<sub>9</sub>' (d,  $J = 5,34\text{ Hz}$ )], 3,88 [(s)], 3,45 [C<sub>8</sub> (m)], 5,10 [C<sub>7</sub> (d,  $J = 9,2\text{ Hz}$ )], 5,66 [(s)], 6,13 [C<sub>8</sub>' (m)], 6,37 [C<sub>7</sub>' (CH) (d,  $J = 15,57\text{ Hz}$ )], 6,78 [C<sub>2</sub> e C<sub>5</sub> (s)], 6,90 [C<sub>6</sub> e C<sub>6</sub>' (s)], 6,97 [C<sub>2</sub>' (s)]

RMN <sup>13</sup>C (50 MHz, CD<sub>3</sub>OD, TMS = 0): 16,99 [C<sub>9</sub> (CH<sub>3</sub>)], 17,83 [C<sub>9</sub>' (CH<sub>3</sub>)], 45,13 [C<sub>8</sub> (CH)], 55,39 [OCH<sub>3</sub>], 93,24 [C<sub>7</sub> (CH)], 108,35 [C<sub>2</sub> (CH)], 108,62 [C<sub>6</sub> (CH)], 112,73 [C<sub>5</sub> (CH)], 113,50 [C<sub>2</sub>' (CH)], 119,41 [C<sub>5</sub>' (C)], 122,94 [C<sub>8</sub>' (CH)], 130,36 [C<sub>6</sub>' (CH)], 131,50 [C<sub>7</sub>' (CH)], 131,62 [C<sub>1</sub> e C<sub>1</sub>' (C)], 132,70 [C<sub>3</sub>' (C)], 143,58 [C<sub>4</sub> (C)], 145,21 [C<sub>3</sub> (C) e C<sub>5</sub>' (C)], 146,10 [C<sub>4</sub>' (C)].

#### 4.4.12 Composto DIEU (α - di - isoeugenol)

Fórmula molecular: C<sub>20</sub>H<sub>24</sub>O<sub>4</sub>

RMN <sup>1</sup>H (200 MHz, CD<sub>3</sub>OD, TMS): 0,95 [C<sub>9</sub> (d,  $J = 7,34\text{ Hz}$ )], 1,03 [C<sub>10</sub> (d,  $J = 7,22\text{ Hz}$ )], 1,35 [8b-H (m)], 1,40 [8<sup>a</sup> (m)], 1,70 [8b (m)], 2,48 [C<sub>2</sub> (m)], 2,91 [C<sub>1</sub> (m)], 3,73 [C<sub>3</sub> (d,  $J = 9,5\text{ Hz}$ )]; 3,81 [(s)], 3,90 [(s)], 5,48 [(s)], 6,48 [C<sub>4</sub> (s)], 6,62 [C<sub>2</sub>' (s)], 6,67 [C<sub>6</sub>' (d,  $J = 1,56\text{ Hz}$ )], 6,77 [C<sub>7</sub> (s)], 6,84 [C<sub>5</sub>' (d,  $J = 7,91\text{ Hz}$ )].

RMN <sup>13</sup>C (50 MHz, CD<sub>3</sub>OD, TMS = 0): 12,48 (9-H), 14,05 (10-H), 22,62 (8<sup>a</sup>-H), 48,75 (1-H), 49,48 (2-H), 56,37 [(3-H) e (OCH<sub>3</sub>-3')], 56,97 (OCH<sub>3</sub>-5), 107,14 (2'-H), 110,88 (7-H), 111,25 (11-H), 114,23 (5'-H), 121,74 (6'-H), 136,08 (12-H), 139,39 (7-H), 139,96 (4-H), 144,33 (4'-H), 144,76 (3'-H), 145,29 (5-H), 146,70 (6-H).



#### 4.5 MÉTODOS ANALÍTICOS EMPREGADOS NA DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DOS MARCADORES QUÍMICOS SAZONAIS PRESENTES NOS DIFERENTES ÓRGÃOS VEGETAIS DA *PIPER SOLMSIANUM* C.DC. VAR. *SOLMSIANUM*

Os procedimentos analíticos em cromatógrafo gasoso equipado com detector de ionização de chama (CG/FID) foram realizados no Núcleo de Investigações Químico-Farmacêuticas (NIQFAR) da Universidade do Vale do Itajaí (UNIVALI) pelo aluno Tiago Floriani Preti (graduando do curso de Farmácia-UNIVALI) sob a orientação da professora Dr<sup>a</sup>. Marina da Silva Machado com as frações hexânica e diclorometano e os padrões para a curva de calibração: conocarpano, eupomatenóide-3 e eupomatenóide-5 isolados da espécie vegetal *Piper solmsianum* C.DC. variedade *solmsianum*. As análises estatísticas dos dados foram determinadas pelos professores: Dr<sup>a</sup>. Marina da Silva Machado e MSC. Léo Lynce do Valle Lacerda (CTTMar e Proen UNIVALI) e o aluno Tiago F. Preti.

As análises em cromatógrafo líquido de alta resolução (CLAE) equipado com detector por arranjo de fotodiodo em UV-VIS foram realizadas no Núcleo de Investigações Químico-Farmacêuticas (NIQFAR) da Universidade do Vale do Itajaí (UNIVALI) pela Dr<sup>a</sup>. Marina da Silva Machado (professora), Patrícia W. Rosa (técnica do laboratório), Tiago Floriani Preti (aluno de graduação do curso de Farmácia) e Tatiana Ceccato (estagiária do laboratório, aluna do curso de farmácia) com a fração acetato de etila e os padrões para as curvas de calibrações: orientina, 7-metoxi-apigenina e hesperidina isolados da espécie vegetal *Piper solmsianum* C.DC. var. *Solmsianum*.

##### 4.5.1 Material Vegetal

Foram coletadas amostras dos diferentes órgãos vegetais (raiz, caule, folha e flor) da *Piper solmsianum* C.DC. var. *solmsianum* nas quatro estações do ano (verão,

outono, inverno e primavera) no município de Ponta Grossa – Paraná, perfazendo um total de 48 amostras.

Após a coleta, estes materiais vegetais foram reduzidos a pequenos pedaços e colocados para dessecar separadamente a temperatura ambiente até a sua completa desidratação.

#### 4.5.2 Extratos Vegetais

Foram pesadas exatamente 5 g de cada órgão (raíz, caule, folha e flor) do outono, inverno, primavera e verão da espécie vegetal em estudo e posteriormente, foram colocados para macerar separadamente em recipientes fechados, a temperatura ambiente e ao abrigo da luz. As extrações ocorreram de forma consecutiva em presença de 100 mL de hexano, 100 mL diclorometano e 100 mL de acetato de etila. Decorrido os tempos de macerações, os extratos foram filtrados e concentrados em evaporador rotatório sob pressão reduzida, obtendo-se 48 extratos brutos, totalizados em: 16 extratos de hexano, 16 extratos de diclorometano e 16 extratos de acetato de etila, os quais foram mantidos em dessecadores contendo sílica com indicador de umidade para a sua completa desidratação. Posteriormente, os mesmos foram pesados para obtermos as suas respectivas massas e assim efetuarmos os cálculos dos seus rendimentos. Finalmente, foram realizadas as análises cromatográficas de conformidade como é demonstrado na figura 10 abaixo<sup>94</sup>.

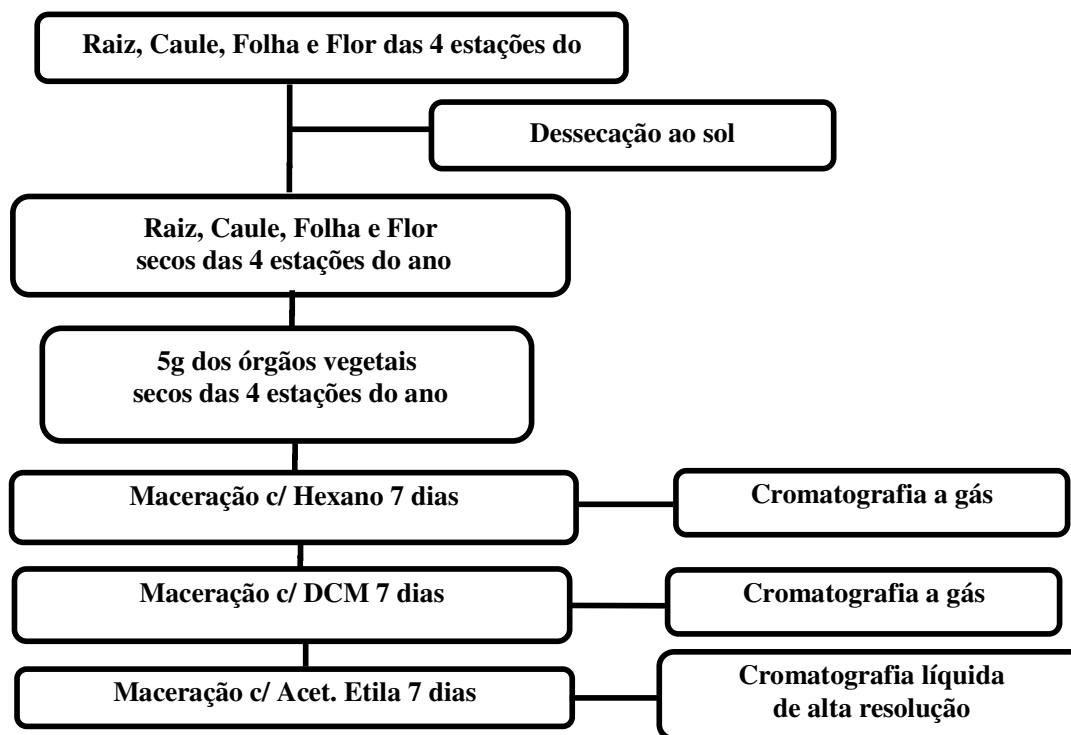


FIGURA 10 - Fluxograma dos procedimentos realizados no controle de qualidade sazonal da *Piper solmsianum* var. *solmsianum*<sup>94</sup>

#### 4.5.3 Preparação das Amostras para Análise em CG/FID e CLAE

No processo de preparação das amostras para as análises em cromatógrafo gasoso (CG/FID) foi selecionado o diclorometano grau HPLC no volume mínimo de 1 mL como sendo o melhor solvente para a dissolução das amostras por promover a completa e homogênea solubilização de 5 mg dos extratos. As amostras que foram analisadas por cromatografia líquida de alta resolução (CLAE) o solvente selecionado foi 1 mL metanol grau HPLC para a completa e homogênea dissolução de 5 mg de extrato.

#### 4.5.4 Análises cromatográficas

O estudo analítico da sazonalidade da espécie vegetal *Piper solmsianum* C.DC. var. *solmsianum* visa a padronização dos seus extratos, estabelecendo parâmetros comparativos das concentrações dos marcadores químicos sazonais presentes nos diferentes órgãos vegetais (raíz, caule, folhas e flores) nas quatro estações do ano por métodos cromatográficos de alta resolução.

O método utilizado foi o da padronização externa que relaciona a área dos compostos de interesse (as neolignanas e flavonóides) de uma amostra com as áreas obtidas com soluções conhecidas a partir de padrões<sup>95,96</sup>.

As frações hexânica e diclorometano bem como os padrões de neolignanas que foram empregadas como marcadores químicos sazonais para a elaboração das curvas de calibrações: conocarpano (**15**), eupomatenóide-5 (**16**) e eupomatenóide-3 (**24**) foram analisadas em cromatógrafo gasoso equipado com detector de ionização de chama (CG/FID). A fração acetato de etila e os padrões dos flavonóides utilizados como marcadores químicos sazonais para preparação das curvas de calibrações: orientina (**56**), hesperidina (**57**), 7-metoxi-apigenina (**58**) foram analisados em cromatógrafo líquido de alta resolução (CLAE) equipado com detector por arranjo de fotodiodos em UV-VIS. As frações hexânica, diclorometano e acetato de etila e os padrões dos marcadores químicos sazonais foram obtidos dos processos de extração, isolamento e purificação da espécie vegetal em estudo. A quantificação destes marcadores químicos sazonais foi estabelecida pela relação existente entre as áreas dos picos, determinadas pelos cromatogramas obtidos por CG e CLAE, com as concentrações obtidas mediante as curvas de calibração. As concentrações foram obtidas através das equações de regressão lineares obtidas ( $Y = A + BX$ ). Estes métodos analíticos se constituem em uma ferramenta poderosa capaz de monitorar as pesquisas fitoquímicas<sup>94,95</sup>.

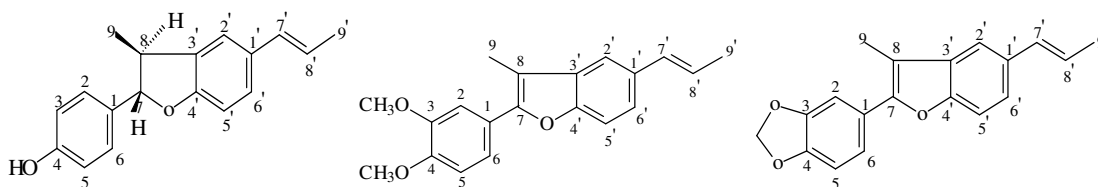
#### 4.5.5 Otimização das Condições em CG/FID

O processo de otimização das condições para as análises em cromatógrafo gasoso, avaliou os tempos de retenção, a simetria dos picos e a melhor resolução cromatográfica para a separação de todos os constituintes presentes nos extratos.

As análises foram realizadas em cromatógrafo gasoso com detector de ionização de chama (CG/FID) Shimadzu modelo GC-14B com coluna DB1 de 30 m x 0,25  $\mu$  de diâmetro interno. As amostras dos extratos foram preparadas na concentração de 5 mg/mL, usando como solvente o diclorometano. Com auxílio de uma microseringa tipo Halmilton foi injetado uma alíquota de 1  $\mu$ L da solução de extrato no cromatógrafo no modo de divisão de fluxo (*split* de 30 mL/min) e purga do septum de 10 mL/min. O gás de arraste foi o hidrogênio com velocidade de fluxo constante de 1 mL/min. As condições de programação foram: temperatura da coluna iniciando em 80°C por 2 min e com velocidade de programação de 8°/min até 290°C com isoterma de 15 minutos, temperatura do injetor de 270°C e temperatura do detector de 290°C.

As curvas de calibração foram construídas usando as condições descritas acima, com as amostras padrão de conocarpano (**15**), eupomatenóide-5 (**16**) e eupomatenóide-3 (**24**).

As injeções foram realizadas em triplicata. A média das triplicatas das áreas registradas no GC e, através da equação da curva de calibração foi calculada a concentração dos marcadores nas amostras de extrato. Diariamente, antes das injeções das soluções de extrato no cromatógrafo era injetado um padrão de controle, onde as áreas dos marcadores eram integradas e comparadas com as dos dias anteriores. As soluções de extrato só eram injetadas quando a área dos marcadores estava na faixa dos dias anteriores. Os padrões de controle utilizados foram soluções de extrato de folha e/ou flor de inverno (extrato de diclorometano). Os picos foram identificados por comparação com os seus tempos de retenção dos obtidos dos padrões e suas áreas foram integradas usando o *software* integrador da Microquímica.



Conocarpano (15)

Eupomatenóide -5 (16)

Eupomatenóide-3 (24)

#### 4.5.6 Otimização das Condições em CLAE

As análises foram realizadas em cromatógrafo líquido de alta resolução da marca *Waters* com detector por varredura de espectro ao ultravioleta por arranjo de fotodiodos (PAD 2996) e injetor *Rheodyne 7725i* com volume de injeção (Loop) de 20  $\mu$ L. A coluna cromatográfica empregada foi  $C_{18}$  de dimensões 250 x 4,6 mm, dotada de pré-coluna com as mesmas especificações. A temperatura de trabalho para o forno da coluna foi programada para 25°C com fluxo de fase móvel constante. A composição da fase móvel variou em gradiente de acetonitrila - água ultrapura acidificada com ajuste de pH para 3,5 com ácido orto fosfórico 0,05 %, filtrada com membrana *Millipore* de 0,45  $\mu$ m e degaseificada antes do uso, nas proporções de 15:85 (v:v) e 85:15 (v:v). O tempo total de corrida foi de 60 minutos, seguida de 15 minutos de purga em 100 % de acetonitrila na coluna. A vazão da fase móvel permaneceu a 1,5 mL/min, de acordo com a tabela 17 abaixo. Foram preparadas soluções na concentração de 5 mg/mL, usando como solvente o metanol, os quais foram filtrados em membrana *Millipore* de 0,45  $\mu$ m. Com auxílio de microseringa foram injetadas alíquotas de 20  $\mu$ L. Detecção por varredura de espectro de 200 nm a 400 nm, com acompanhamento em 3 comprimentos de onda, 256,6 nm, 267,9 nm e 284,5 nm<sup>97</sup>.

O método utilizado foi o da padronização externa que relaciona a área dos compostos de interesse de uma amostra com as áreas obtidas com soluções conhecidas a partir de padrões<sup>96</sup>. As injeções foram realizadas em triplicata. Diariamente, antes das injeções das soluções dos extratos no cromatógrafo foi injetado um padrão de amostra controle, extrato flor de outono e/ou flor de inverno, onde as áreas dos

marcadores foram integradas e comparadas com as dos dias anteriores para se verificar a reprodutibilidade. As curvas de calibrações foram construídas usando as condições descritas acima, com as amostras padrões de orientina (**56**), hesperidina (**57**) e 7-metoxi-apigenina (**58**).

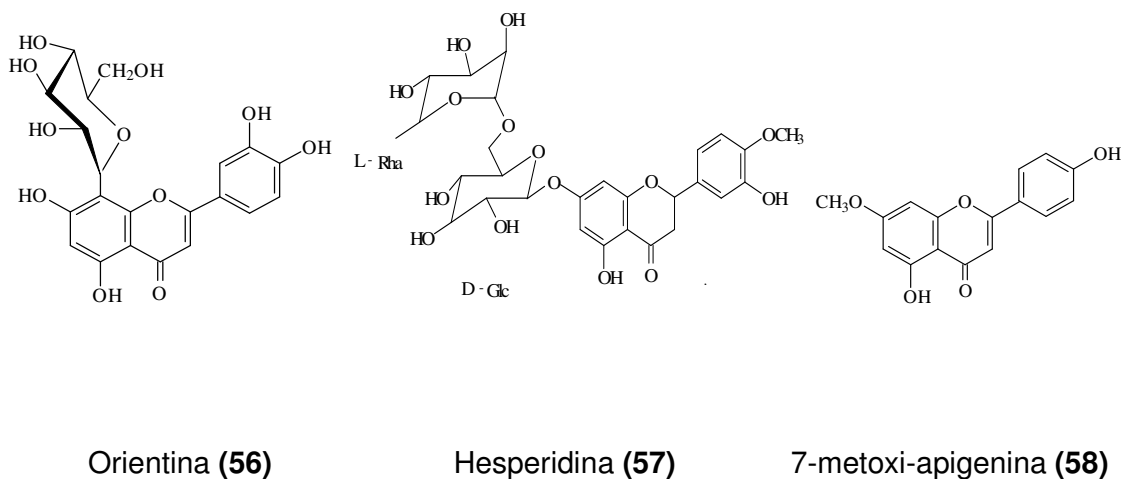


TABELA 17 – Sistema de gradiente utilizado para análise em CLAE

TEMPO (MIN)	FLUXO (mL/MIN)	% A	% B
5,0	1,50	15	85
10,0	1,50	15	85
15,0	1,50	15	85
20,0	1,50	15	85
50,0	1,50	85	15
60,0	1,50	85	15

NOTA: Solvente A: acetronitrila e solvente B: Fase aquosa ácida pH 3,5 (ác.ortofosfórico).

#### 4.5.7 Curvas de Calibração das Neolignanas em CG/FID

A curva de calibração do conocarpano foi obtida a partir de diluições sucessivas de uma solução de 4 mg/mL de conocarpano (padrão isolado) em diclorometano (solução mãe). As concentrações utilizadas para o preparo desta curva foram de 4,0; 2,0; 1,33; 0,5; 0,25; 0,125; 0,0625; 0,0125 mg/mL.

A curva de calibração do Eupomatenóide-5 foi obtida a partir de diluições sucessivas de uma solução de 1 mg/mL de Eupomatenóide-5 (padrão isolado) em

diclorometano (solução mãe). As concentrações utilizadas para o preparo desta curva foram de 1,0; 0,5; 0,25 e 0,1 mg/mL.

A curva de calibração do Eupomatenóide-3 foi obtida a partir de diluições sucessivas de uma solução de 1 mg/mL do composto puro (padrão isolado) em diclorometano (solução mãe). As concentrações utilizadas para o preparo desta curva foram de 1,0; 0,5; 0,25; 0,1 e 0,02 mg/mL.

Cada concentração das respectivas soluções padrão foi injetada, no mínimo em triplicata, e a partir desses dados foi calculada a área média do pico referente ao conocarpano, Eupomatenóide -5 e Eupomatenóide -3. Foi plotado um gráfico da área média do pico dos marcadores em função da concentração dos mesmos nas respectivas soluções padrões usando o *software* Origin 5.0 conforme mostrado nas figuras 11, 12, 13. Foi realizada uma análise de regressão, onde foi calculado o coeficiente de determinação ( $r^2$ ) e a equação da curva. Realizou-se uma ANOVA da regressão para testes de intercepto, onde  $p > 0,05$  não foram considerados significativos desprezando-se o intercepto.

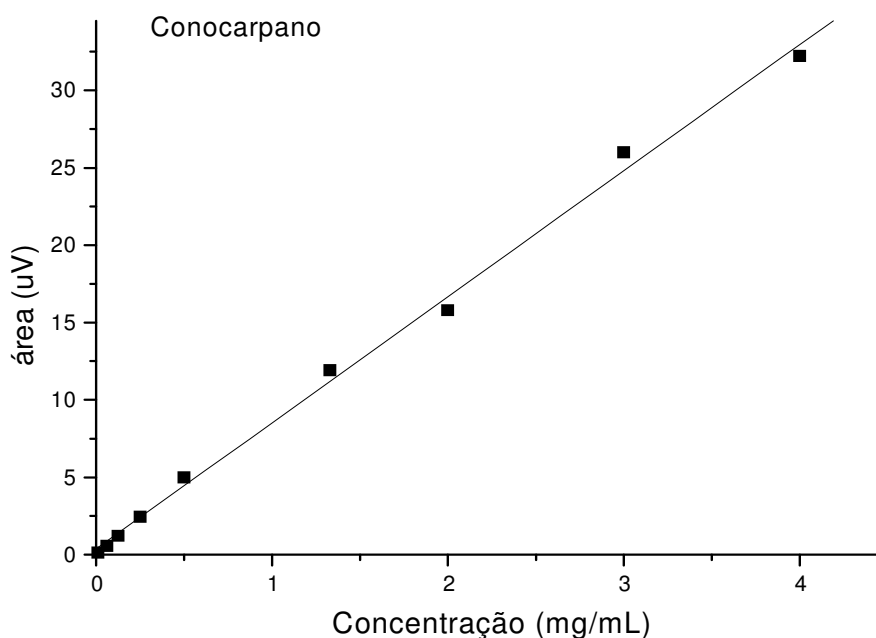


FIGURA 11 - Curva de calibração do conocarpano em diclorometano.



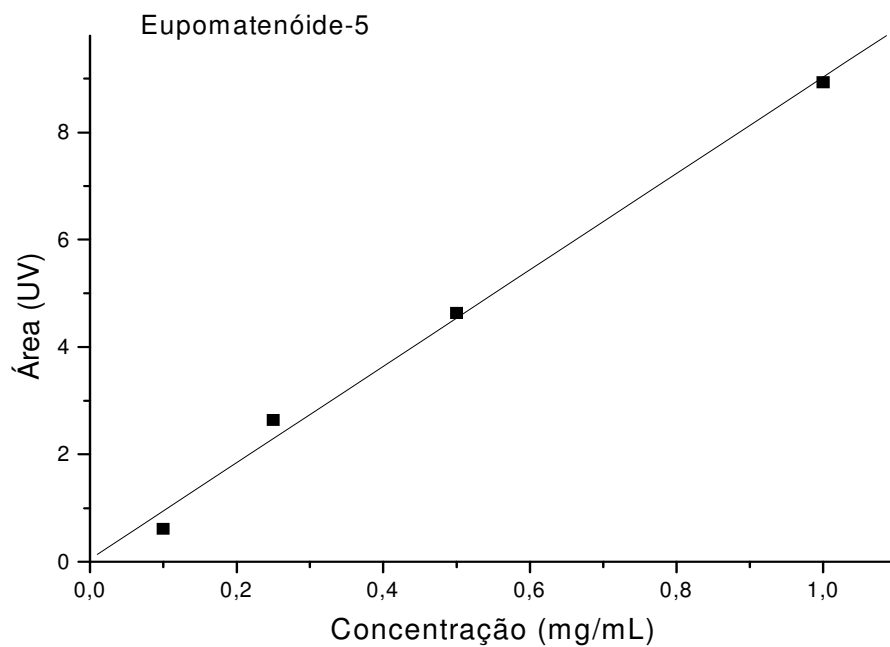


FIGURA 12 - Curva de calibração do Eupomatenóide -5 em diclorometano

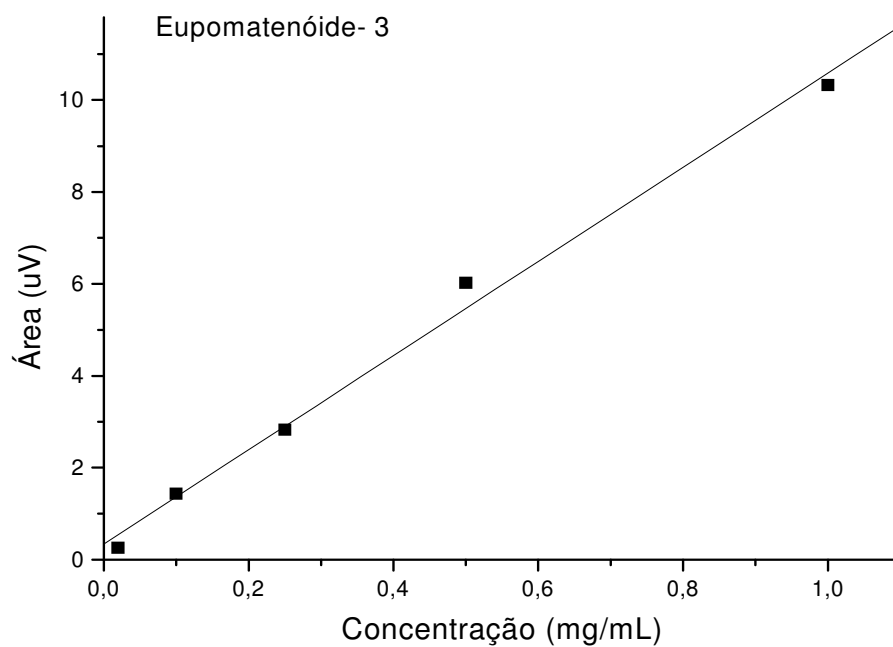


FIGURA 13 - Curva de calibração do Eupomatenóide – 3 em diclorometano

#### 4.5.8 Curvas de Calibração dos Flavonóides em CLAE

A curva de calibração da orientina foi obtida pela análise de sete soluções. Essas soluções foram obtidas através de diluições sucessivas a partir de uma solução mãe de concentração inicial de orientina 0,2; 0,1; 0,075; 0,05; 0,03; 0,015 e 0,008 mg/mL

A curva de calibração da hesperidina foi obtida pela análise de quatro soluções. Essas soluções foram obtidas através de diluições sucessivas a partir de uma solução mãe de concentração inicial de hesperidina de 0,59; 0,3; 0,0983 e 0,0492 mg/mL.

A curva de calibração da 7-metoxi-apigenina (genkwanina) foi obtida pela análise de cinco soluções. Essas soluções foram obtidas através de diluições sucessivas a partir de uma solução mãe de concentração inicial de 7-metoxi-apigenina de 0,170; 0,125; 0,100; 0,05 e 0,0208 mg/mL.

Todas as análises foram realizadas em triplicatas. A curva de calibração foi construída com a média dos valores encontrados em cada concentração e plotadas pelo *software Empower – Pró*. A equação da reta foi calculada através de regressão linear e esta demonstrada abaixo nas figuras 14, 15 e 16.

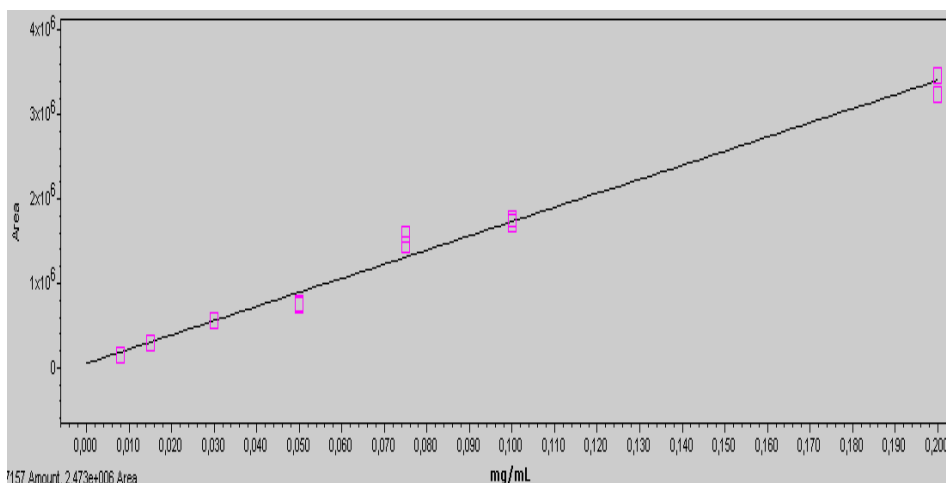


FIGURA 14 - Curva de calibração da orientina em metanol

A equação de regressão linear da orientina é  $Y = 1,68e + 007X + 5,52e + 004$  e o coeficiente de correlação,  $r = 0,994120$ .

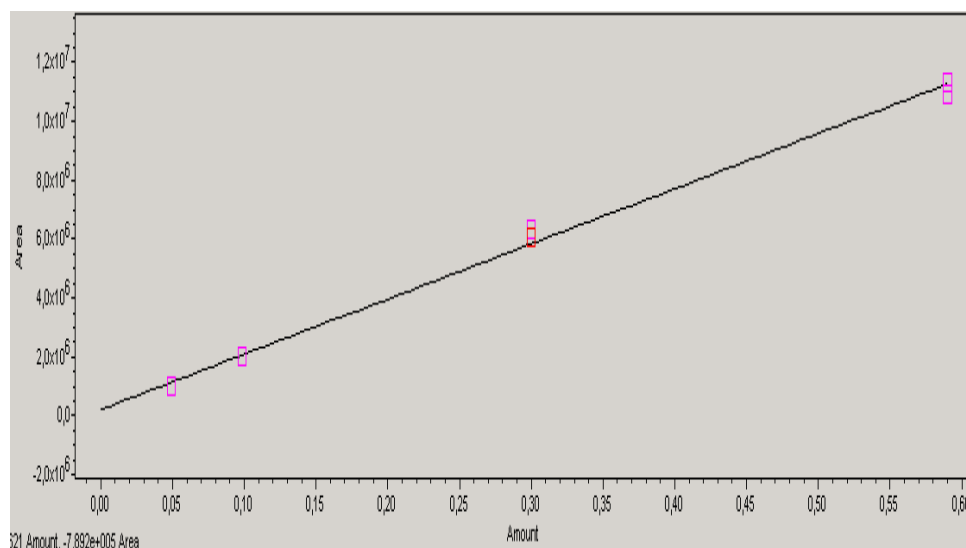


FIGURA 15 - Curva de calibração da Hesperidina em metanol

A equação de regressão linear da Hesperidina é  $Y = 1,92e + 007X$  e o coeficiente de correlações,  $r = 0,997658$ .

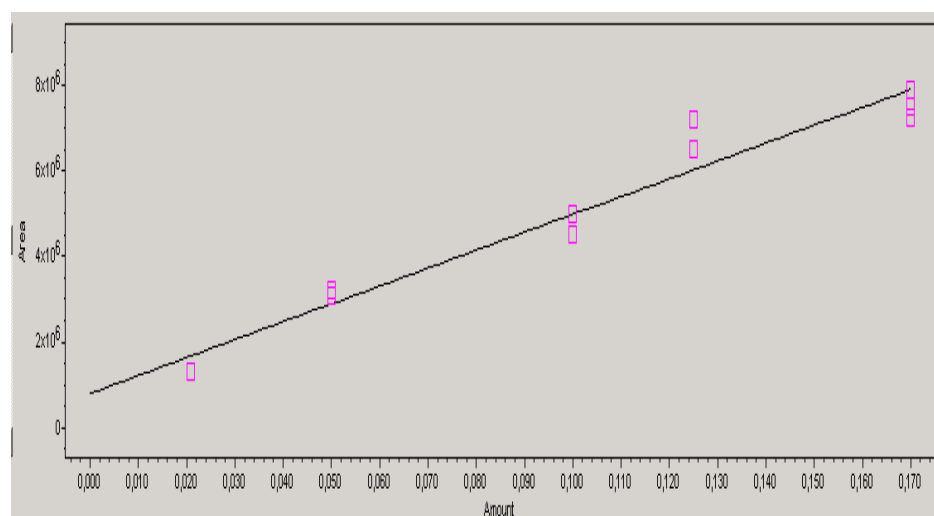


FIGURA 16 - Curva de calibração da genkwanina em metanol

A equação de regressão linear da Genkwanina é  $Y = 4,18e + 007X + 8,00e + 005$  e o coeficiente de correlações,  $r = 0,976658$ .

#### 4.5.9 Análise Estatística

Para verificar a reprodutibilidade dos dados foi empregado à análise de média, e de desvio padrão e do coeficiente de variação (CV). As análises foram consideradas reprodutíveis para CV (RSD) < 12 %<sup>96</sup>.

As diferenças entre as concentrações obtidas das curvas-padrão foram testadas por meio de Análise de Variância (ANOVA) com três fatores, a saber: o extrato da planta, a parte da planta e a estação do ano de coleta e suas interações. Foi utilizado o Teste de Tukey para a comparação de médias *a posteriori*. Com relação a parte da planta, o caule não foi analisado tendo em vista que os resultados mostraram concentrações abaixo do limite de quantificação da técnica. Foi utilizado um *software* estatístico, o Estatística 6.0, onde valores que corresponderam a  $p < 0.05$  foram considerados estatisticamente significantes. Os dados dos três tipos de neolignanas foram considerados de distribuição normal.

#### 4.6 ENSAIOS BIOLÓGICOS

Os testes farmacológicos com o extrato metanólico bruto, as frações: hexano, diclorometano e acetato de etila, a flavona orientina, a neolignana conocarpano e seus derivados metilados, acetilados e benzoilados, obtidos das folhas de outono de *Piper solmsianum* C.DC. variedade *solmsianum* foram realizados no Núcleo de Investigações Químico-Farmacêuticas (NIQFAR) da Universidade do Vale do Itajaí (UNIVALI) pela professora Dr<sup>a</sup>. Márcia Maria de Souza.

Os testes antibacterianos e antifúngicos foram realizados no NIQFAR/UNIVALI pela aluna de mestrado Marina Pereira dos Campos sob a orientação do Prof. Dr. Alexandre Bella Cruz em parceria com a Dr. Susana Zacchino da Facultad de Farmacia y Bioquímica, da Universidad Nacional de Rosario – Argentina com o extrato metanólico bruto, frações: hexânica, diclorometano e acetato de etila, flavona orientina e as neolignanas benzofurânicas: conocarpano,

eupomatenóide-3 e eupomatenóide-5 obtidos das folhas de outono de *Piper solmsianum* C.DC. variedade *solmsianum*.

#### 4.6.1 Atividade Analgésica

##### 4.6.1.1 Tratamentos

A dose utilizada para o screening do Extrato metanólico bruto, frações: hexânica, diclorometano e acetato de etila, orientina, conocarpano e derivados do conocarpano foi de 10 mg/kg. Foram feitas curvas dose-resposta da orientina e a dose utilizada para o estudo do mecanismo de ação foi de 10 mg/kg ip. As vias de administração escolhidas para o estudo foram a intraperitoneal e oral<sup>98</sup>.

##### 4.6.1.2 Animais

Foram utilizados camundongos “Swiss” de ambos os sexos, pesando entre 18 g a 35 g, obtidos do Biotério Central da UNIVALI, onde eram aclimatados a  $22 \pm 2$  °C, num ciclo de 12 horas claro e 12 horas escuro e tratados com ração e água “*ad libitum*”. Os animais foram mantidos no laboratório 1 hora antes da realização dos experimentos para aclimação, sendo que os experimentos foram conduzidos de acordo com as normas internacionais para o estudo com os animais de laboratório (ZIMMERMANN, 1983)<sup>98</sup>.

##### 4.6.1.3 Fármacos

Para os ensaios farmacológicos, foram utilizados os seguintes fármacos e/ou compostos: Orientina, Ácido acético 0,6 %, Salina 0,9 %, Formalina 2,5 %.

##### 4.6.1.4 Modelo de contorções abdominais induzidas pelo ácido acético

O teste das contorções abdominais induzidas pelo ácido acético se constitui em um modelo de nocicepção simples e pouco específico, o qual permite avaliar a atividade antinociceptiva de várias substâncias que atuam tanto em nível central quanto periférico. A resposta nociceptiva foi induzida pela injeção intraperitoneal de ácido acético (0,6 %) diluído em solução salina (0,9 %). Basicamente as contorções abdominais consistem na contração da musculatura abdominal juntamente com a extensão de uma das patas posteriores. Grupos de animais foram pré-tratados com o extrato metanólico bruto, frações e compostos obtidos da *Piper solmsianum* pela via intraperitoneal (30 min.) ou via oral (60 min.) antes da injeção do ácido acético, respectivamente<sup>99,100</sup>.

Os grupos controle receberam o mesmo volume dos veículos (10 mL/Kg) utilizados para diluir o extrato, frações e compostos. Após a injeção do ácido acético os animais foram colocados sob funis de vidros individuais, e o número de contorções abdominais foi quantificado cumulativamente durante um período de 20 minutos. A atividade antinociceptiva foi determinada tomando-se como base a inibição do número das contorções abdominais dos animais pré-tratados com o extrato metanólico bruto, frações e compostos<sup>99, 100</sup>

#### 4.6.1.5 Modelo de dor induzida pela formalina

Para a confirmação do possível efeito antinociceptivo do extrato metanólico bruto, frações e compostos obtidos da *Piper solmsianum* o procedimento utilizado foi similar ao descrito por HUNSKAAR & HOLE (1987)<sup>101</sup>. Os animais receberam 20 µL de formalina a 2,5 % (0,92 % de formaldeído) na região subplantar da pata posterior direita ou esquerda. Após a injeção de formalina os animais foram colocados, individualmente, sob um funil de vidro, ao lado de um espelho para facilitar a observação. O tempo em que os animais permaneceram lambendo ou mordendo a pata injetada com formalina foi cronometrado, sendo esse tempo, considerado como indicativo de dor. Neste modelo são considerados dois tipos de dores: a neurogênica (aguda) e a inflamatória (crônica).

A fase neurogênica da dor compreende os 5 primeiros minutos enquanto que a fase crônica corresponde aos últimos 15 minutos do teste. Ao final do tempo de observação, os animais foram sacrificados por deslocamento cervical.

Os animais receberam o extrato metanólico bruto, frações e compostos da *Piper solmsianum* 10 mg/Kg 30 minutos antes do teste da formalina a 2,5 %.

#### 4.6.1.6 Análise estatística

Os resultados foram apresentados como a média  $\pm$  erro padrão da média para cada grupo de experimentos, exceto as  $DI_{50}$ s (dose da orientina que reduz a resposta em 50 % em relação ao grupo controle), que foram apresentadas como médias geométricas acompanhadas de seus respectivos limites de confiança, em nível de 95 %.

As análises estatísticas dos resultados foram realizadas por meio de análise da variância seguida pelo teste de múltipla comparação utilizando-se o método de Dunnett e/ou Newman-Keuls, quando apropriado. Valores de  $P < 0,05$  foram considerados como indicativo de significância. As  $DI_{50}$  foram estimadas a partir de experimentos individuais utilizando-se o método de regressão linear através do programa GraphPad<sup>®</sup> (Prism).

### 4.7 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

Foi avaliado o potencial antimicrobiano do extrato metanólico bruto, frações: hexano, diclorometano, acetato de etila e compostos puros: orientina, conocarpano, eupomatenóide-3 e eupomatenóide-5 obtidos das folhas de outono de *Piper solmsianum* C.DC. variedade *solmsianum* pelo método de diluição em ágar para a determinação da concentração inibitória mínima e concentração microbicida (bactericida e fungicida) mínima conforme dissertação de mestrado da aluna Marina Pereira de Campos, do centro de Ciências da Saúde da Universidade do Vale do Itajaí – UNIVALI<sup>102</sup>.

#### 4.7.1 Amostras Microbiológicas e Meios de Cultura

Para a determinação da atividade antimicrobiana, foram utilizadas as cepas padrões dos microrganismos foram da *American Type Culture Collection* (ATCC) (Rockville, MD, USA) obtidos da Fundação Tropical de Pesquisa e Tecnologia André Tosello de Campinas – SP, bem como isolados clínicos fornecidos pelo Centro de Referência Micológica (C) (CEREMIC, Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacêuticas Suipacha, 531, (2000) Rosário, Argentina) e Control Lab (CL 35) (Control Lab, Rio de Janeiro, Brasil). Foram testadas as bactérias *Bacillus cereus* (ATCC 14579), *Escherichia coli* (ATCC 11775), *Salmonella typhimurium* (ATCC 14028), *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538P), *Staphylococcus saprophyticus* (ATCC 35552) e *Streptococcus agalactiae* (ATCC 13813), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC27853) e *Enterobacter cloacae* (CCT1454); os fungos filamentosos *Aspergillus flavus* (ATCC 9170), *Aspergillus fumigatus* (ATCC 26934), *Aspergillus niger* (ATCC 9092), *Rhizopus sp.*(CL35), *Microsporum canis* (C112), *Microsporum gypseum* (C115), *Trichophyton mentagrophytes* (ATCC 9972), *Trichophyton rubrum* (C 137), *Epidermophyton floccosum* (C114); as leveduras *Candida albicans* (ATCC 10231), *Candida tropicalis* (ATCC 7349) e *Cryptococcus neoformans* (ATCC 32264).

As bactérias foram mantidas em tubos contendo ágar nutritivo e conservadas sob refrigeração (4°C) no Laboratório de Pesquisa em Microbiologia do curso de Farmácia da UNIVALI, sendo repicadas em intervalos de 20 dias para manter as colônias viáveis.

Os fungos foram mantidos em ágar Sabouraud - dextrose (Merck, 5438) no Laboratório de Pesquisa em Microbiologia do curso de Farmácia da UNIVALI, as leveduras foram armazenadas em estufa a 37 °C por 48 horas, e os fungos filamentosos à temperatura ambiente, sendo subcultivados em intervalos de 15 dias para prevenir as transformações pleomórficas.

As leveduras foram cultivadas em ágar Sabouraud-dextrosado pelo menos duas vezes para assegurar pureza e viabilidade das culturas jovens de 24 a 48 horas a 37°C, foram feitas as suspensões dos inóculos, selecionando 5 colônias de leveduras A



suspensão de células em água destilada e esterilizada foi ajustada para dar uma concentração final de  $1 \times 10^6$  para  $5 \times 10^6$  células das leveduras/mL, padronizado com 0,5 na escala *McFarland* ( $\lambda = 530$  nm).

Os inóculos foram preparados ao remover os fungos esporulados do ágar elevado com uma alça e suspendê-lo em 10 mL de água esterilizada.

As suspensões de fungos foram filtradas através de gaze esterilizada para remover a hifa. As suspensões resultantes de *Conidia* foram vigorosamente mexidas e ajustadas para  $1,4 \times 10^6$  UFC/mL ao adicionar água destilada e esterilizada usando uma câmara de contagem de células hemacitômetro<sup>103</sup>.

#### 4.7.2 Método da Diluição em ágar para a Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)

A atividade antifúngica do extrato metanólico bruto, frações: hexano, diclorometano, acetato de etila e compostos puros obtidos das *Piper solmsianum* foram avaliados pela CIM, cujos valores foram determinados pela técnica da macrodiluição<sup>104</sup>. Em frascos de vidro de 5 mL as soluções estoque das amostras foram diluídas em uma solução 5 % de dimetilsulfóxido: água (DMSO 1:1), foram adicionadas em séries de frascos em diferentes concentrações (1000 a 1 µg/mL). Para as bactérias foi adicionado 1 mL do meio ágar Sabouraud-dextrosado. Após homogeneização da mistura e solidificação dos meios de cultura, os microrganismos previamente ativados foram inoculados nas séries correspondentes, sendo então, incubados a 37°C por 18 a 24 horas para as bactérias, à 37°C por 24 a 48 horas para os fungos leveduriformes, e a temperatura ambiente (25°C) por 5 a 15 dias (acima de 15 dias para dermatófitos) para os fungos filamentosos. Após o período foram realizadas leituras da concentração inibitória mínima através do crescimento microbiano.

Durante os testes foram realizados controles com o solvente utilizado nas solubilizações das amostras, a fim de se verificar seu efeito sobre os microorganismos testados, estes não devem interferir na análise microbiológica. A concentração final de DMSO nos ensaios não excedeu 2 %. Foram utilizados antibacterianos (Amoxicilina e

Vancomicina) e o antifúngico Cetoconazol (Sigma) como sendo os controles positivos, e foram incluídas soluções livres de drogas foram usadas como controle negativo. Os ensaios foram repetidos por quatro vezes.

#### 4.7.3 Bioautografia

Foi usada placa de alumínio com fina camada de Sílica gel 60 F<sub>254</sub> (Merck). Foram aplicadas diluições correspondendo 10 µg para os referidos compostos e 20 µg para o extrato metanólico bruto da e frações obtidos da *Piper solmsianum* C.DC. variedade *solmsianum*. Quatro diferentes sistemas de solventes foram usados para o desenvolvimento das placas. A cromatografia em camada delgada foi desenvolvida com n - hexano: acetato de etila (85:15), n-hexano: acetato de etila (9:1), clorofórmio: metanol (9:1) e clorofórmio: metanol: água (65:35:5). Os cromatogramas foram dessecados com secador de cabelo para a completa remoção do solvente. Todas as placas de cromatografia em camada delgada foram corridas em duplicata, uma delas sendo usada como o cromatograma de referência. Foram detectadas manchas ativas na luz ultravioleta em 254 e 266 nm. Os cromatogramas de referência foram revelados com o reagente Godin.

Uma suspensão de *Staphylococcus aureus*, até uma concentração final de 10<sup>6</sup> cells/mL em ágar Mueller-Hinton (inóculo), mantido a 37°C, foi aplicado na placa desenvolvida. Os cromatogramas foram colocados sobre uma placa quente e mantidos a temperatura de 37°C. Aproximadamente 10 mL do inóculo foi rapidamente distribuído sobre a placa de cromatografia em camada delgada (10 x 10 cm) com uma pipeta esterilizada. Após a solidificação do meio, as placas de cromatografia em camada delgada foram incubadas na noite anterior a 37°C em caixas de polietileno enfileiradas com papel para cromatografia úmida. Os bioautogramas foram nebulizados com uma solução aquosa (2,5 mg/mL) de 2,3,5 trifeniltetrazolium clorado e incubado por 4 horas a 37°C. As zonas de inibição claras foram observadas contra um fundo escuro<sup>105</sup>.

#### 4.7.4 Avaliação do Possível Mecanismo de Ação Antifúngica

O Extrato metanólico bruto, frações hexano e diclorometano e o composto conocarpano isolado da *Piper solmsianum* foram avaliados para verificação da atividade em inibir a parede celular fúngica, através da observação de malformações das hifas no ensaio da *Neurospora crassa*.

No ensaio qualitativo da *Neurospora crassa* foi utilizado meio de cultura com a seguinte composição: 30mL de meio contendo 0,5 % de protease peptona (Britania 02-0700), extrato de levedura (Britania 006-05), 4,0 % sacarose (grau reagente) e 1,5 % ágar (Merck 1613) foi autoclavado a 115°C por 15 minutos. O meio de cultivo foi distribuído em placas de Petri (9 cm de diâmetro) e após resfriamento parcial foi semeado 30 µL do inóculo de esporos de *N. crassa* e incubado a temperatura ambiente sob luz direta. Aguardou-se a solidificação do meio, e aplicou-se sobre este, discos de 0,65 mm (Baxter F-2882-1). As amostras dissolvidas em DMSO foram colocadas sobre os discos (25 µg/disco).

Para preparar o inóculo dos esporos de *N. crassa*, o cultivo foi feito em meio contendo 0,25 % de protease peptona (Difco 0122-01) (p/p), 0,25 % de extrato de levedura (p/p) 1 % de sacarose (p/p) e 1,5 % ágar (p/p) por 4-5 dias de incubação a temperatura ambiente e luz produzindo uma coloração laranja no crescimento das hifas com esporos. O inóculo foi feito em tampão contendo 0,075 g/100 mL K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (grau reagente) em solução de glicerol e água 15:85.

Os discos contendo somente DMSO como controle negativo foi incluído no ensaio e 1,25 µL de cetoconazol (Sigma M-3512) também foi adicionado ao disco como controle positivo os quais produziram um halo claro.

*N. crassa* é um fungo que quando em presença de inibidores da parede celular fúngica e sob certas condições (37°C e meio osmótico), cresce como protoplasma (sem parede celular) e que microscopicamente mostra malformações (hifas curtas e ramificadas). Os halos de inibição foram examinados macroscopicamente para verificar se havia má formação das hifas e se a aparência era de aspecto enevado ou

manchado, seguindo-se a incubação das placas a temperatura ambiente por 24 horas sob luz direta<sup>103, 106, 107, 108</sup>.

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 MATERIAL VEGETAL E CLASSIFICAÇÃO BOTÂNICA

O material vegetal selecionado para a presente investigação fitoquímica e biológica foram às folhas de outono da espécie medicinal conhecida popularmente por caapeba ou pariparoba. Alguns ramos férteis deste arbusto foram coletados visando à preparação de exsicatas que foram enviadas a classificadores botânicos com o intuito de sua caracterização botânica. Os resultados obtidos desta identificação científica, a qual foi realizada primeiramente por dois renomados botânicos sistemáticos e ambos foram unânimes em identificá-la como sendo *Pothomorphe umbellata*. Após seis meses de estudo fitoquímico com este material vegetal e intensa pesquisa bibliográfica cruzando-se os termos: gênero, família e classes de substâncias predominantes, suspeitando-se da possibilidade da identificação científica desta espécie vegetal estar errada, pois através de uma análise quimiotaxonômica, verificou-se que os constituintes químicos isolados eram bem diferentes dos relatados na literatura. Através de estudos multidisciplinares, envolvendo o Dr. Ademir Reis, professor do Departamento de Botânica da Universidade Federal de Santa Catarina e diretor do Herbário Barbosa Rodrigues de Itajaí, procedeu-se um estudo minucioso da exsicata e chegou-se a conclusão que a caracterização botânica estava realmente errada, pois a espécie vegetal não pertencia ao gênero *Photomorphe* e sim ao gênero *Piper*. Apesar de toda a sua experiência, como classificador botânico, o Prof. Ademir Reis me aconselhou a entrar em contato e enviar uma exsicata do material vegetal para uma classificadora botânica especialista em Piperaceae, no museu botânico do Rio de Janeiro, Dr<sup>a</sup>. Elsie Franklin Guimarães. Passados mais seis meses, o material vegetal foi analisado, devidamente identificado e catalogado com a numeração RB 368597 como sendo *Piper solmsianum* C.DC. var. *solmsianum*.

Diante desta problemática, ressalto a importância das pesquisas científicas serem de caráter multidisciplinar, como por exemplo a botânica, a farmacologia, a

microbiologia e a fitoquímica, pois juntas enriquecem os conhecimentos sobre a inesgotável fonte medicinal natural: a flora mundial<sup>21</sup>.

Novas revisões bibliográficas foram realizadas e foram encontrados dois artigos publicados na área de investigação fitoquímica com a espécie vegetal *Piper solmsianum* C.DC. var. *solmsianum*. Em uma das pesquisas, o material vegetal foi coletado em São Paulo/SP e na outra, em Teresópolis/RJ. Em todos os trabalhos científicos a planta foi caracterizada botanicamente pela Dr<sup>a</sup>. Elsie Franklin Guimarães. Embora a espécie vegetal selecionada como alvo desta investigação fitoquímica para a elaboração da presente tese de doutorado não ser inédita, todos os constituintes químicos isolados e identificados, as avaliações biológicas, bem como o controle químico sazonal foram inéditos para a espécie medicinal *Piper solmsianum* C.DC. var. *solmsianum*.

## 5.2 EXTRAÇÃO E PARTIÇÃO LÍQUIDO/LÍQUIDO

São inúmeras as metodologias descritas para a preparação de extratos vegetais, visando o isolamento dos seus constituintes químicos. A técnica de extração escolhida para obtenção dos metabólitos secundários das folhas dessecadas e coletadas no outono de *Piper solmsianum* C.DC. var. *solmsianum* foi a descrita por CECHINEL-FILHO & YUNES (1998) mostrado na figura 3 (**ver p. 18**)<sup>37,109</sup>.

O solvente selecionado para a obtenção do extrato bruto foi o metanol, por possibilitar a extração de maior número de compostos. Posteriormente, este extrato (269,0 g) foi submetido a um processo de partição líquido-líquido, com os solventes de polaridades crescentes, como hexano (16,80 %), diclorometano (12,56 %) e acetato de etila (2,90 %), visando uma separação das substâncias através de suas polaridades.

### 5.3 IDENTIFICAÇÃO DOS COMPOSTOS ISOLADOS NA FRAÇÃO HEXÂNICA

A investigação química com a fração hexânica levou ao isolamento de uma mistura de compostos denominada de Hex - 1/9 e das neolignanas benzofurânicas denominadas de Hex -14/33, Hex – 51/81 e DCM – 22.

#### 5.3.1 Mistura Hex – 1/9

A mistura Hex – 1/9 foi isolada por procedimentos cromatográficos de CC da fração hexânica, após eluição com 100 % hexano, ocorrendo à formação de 265,7 mg de um precipitado semi-sólido amorfo, leitoso e de aspecto gorduroso, o qual foi analisado por cromatografia em camada delgada e cromatografia gasosa e CG/EM. O cromatograma obtido nas condições relatadas na parte experimental (Figura 17) nos revelou que Hex-1/9 trata-se de uma mistura complexa de constituintes apolares.

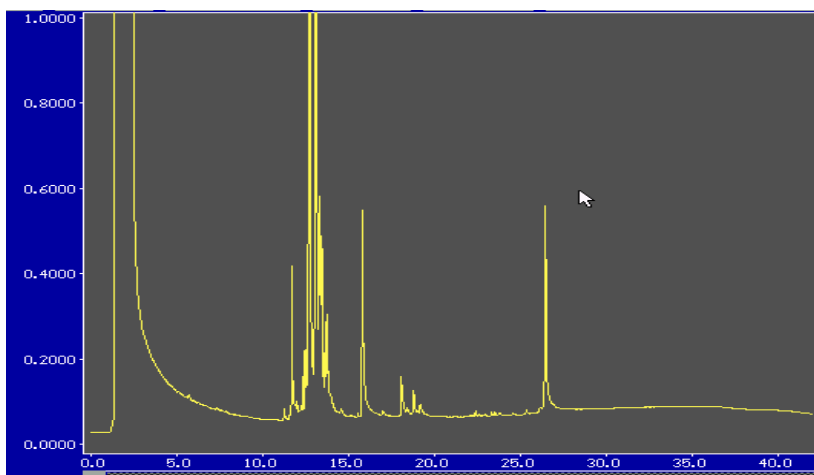


FIGURA 17 - Cromatograma obtido por CG da mistura Hex – 1/9

A mistura Hex-1/9 foi cromatografada em CG/EM, e pode-se observar o cromatograma abaixo (Figura 18), a presença de quatro picos principais, com os seguintes tempos de retenção: Hex – 1/9 A (13,80 min), Hex – 1/9 B (14,20 min), Hex – 1/9 C (17,20 min), Hex – 1/9 D (30,56 min).

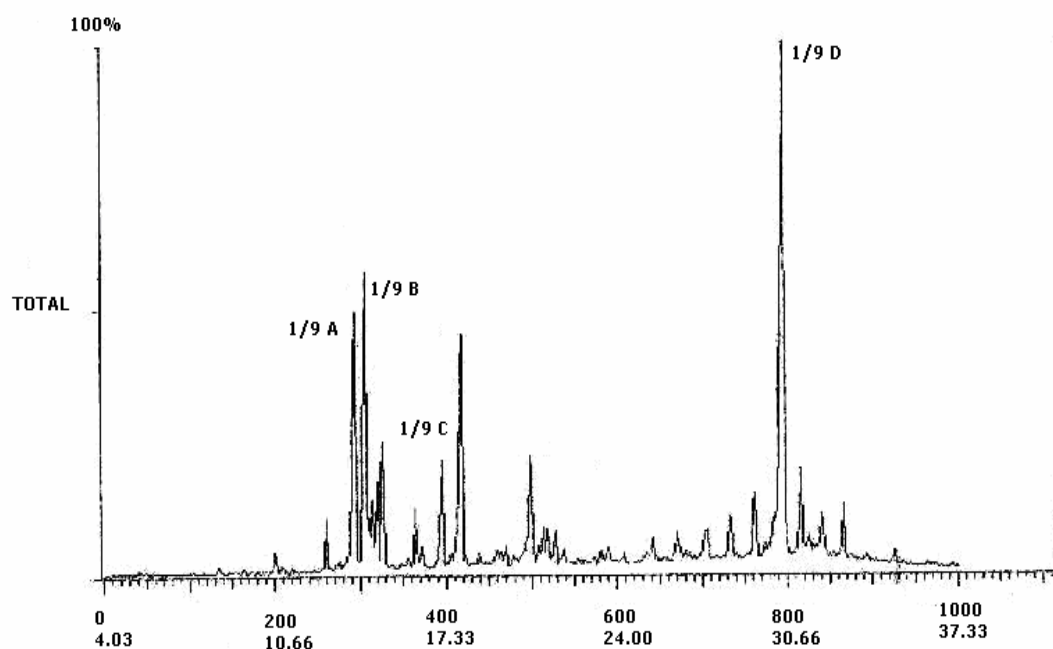


FIGURA 18 - Cromatograma CG/EM da mistura Hex- 1/9

O levantamento bibliográfico realizado para a espécie vegetal *Piper solmsianum* C.DC. var. *solmsianum* nos possibilitou detectar a presença de sesquiterpenos e esteróides, sendo que os dados obtidos no espectro de massas para os constituintes químicos desta mistura se enquadram para estas classes de compostos.

O espectro de massas para do composto Hex – 1/9 A, mostra o sinal do íon molecular em  $m/z$  204 [ $M^+$  20 %], o pico base em  $m/z$  91 [ $M^+$  100 %] e os demais fragmentos, em: 189 (22 %), 161 (49 %), 147 (24 %), 133 (44 %), 119 (46 %), 105 (70 %), 91 (100 %), 79 (79 %), 55 (71 %), 53 (40 %), padrão de fragmentação muito semelhante ao da literatura, nos sugerindo que o composto seja um sesquiterpeno isomérico<sup>52, 54, 57</sup> (Figura 19), a qual necessita de análises complementares para a sua devida elucidação.



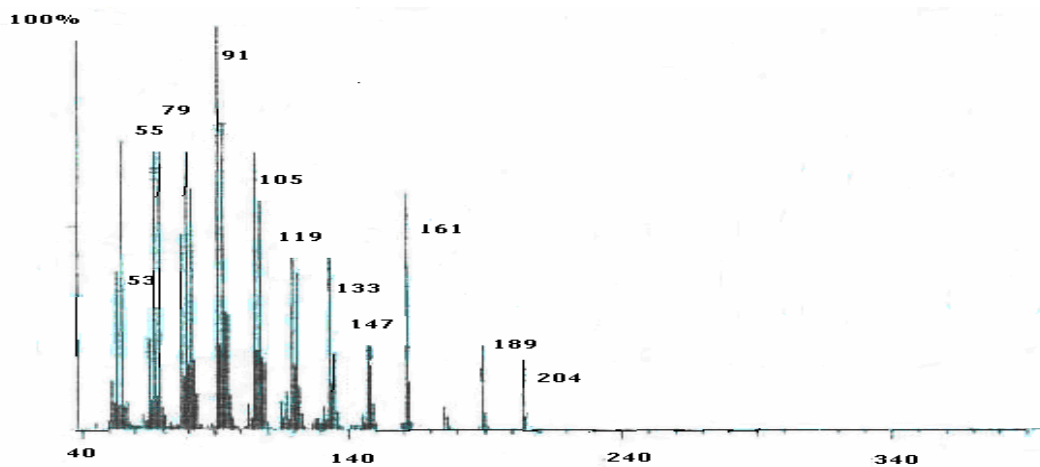


FIGURA 19 - Cromatograma CG/EM do composto Hex – 1/9 A da fração hexânica

O espectro de massas do hidrocarboneto Hex – 1/9 B, mostra o pico do íon molecular em  $m/z$  204 [ $M^+$  50 %], o pico base em  $m/z$  105 [ $M^+$  100%] e os demais fragmentos, em: 189 (32 %), 161 (22 %), 148 (36 %), 133 (33 %), 123 (52 %), 93 (85 %), 81 (55 %), 55 (62 %), 53 (21 %) (Figura 20). Estes dados foram comparados com padrões de fragmentações da literatura e nos indicam que o composto seja um sesquiterpeno isomérico, porém necessita de análises complementares para a sua elucidação<sup>52, 54, 57</sup>.

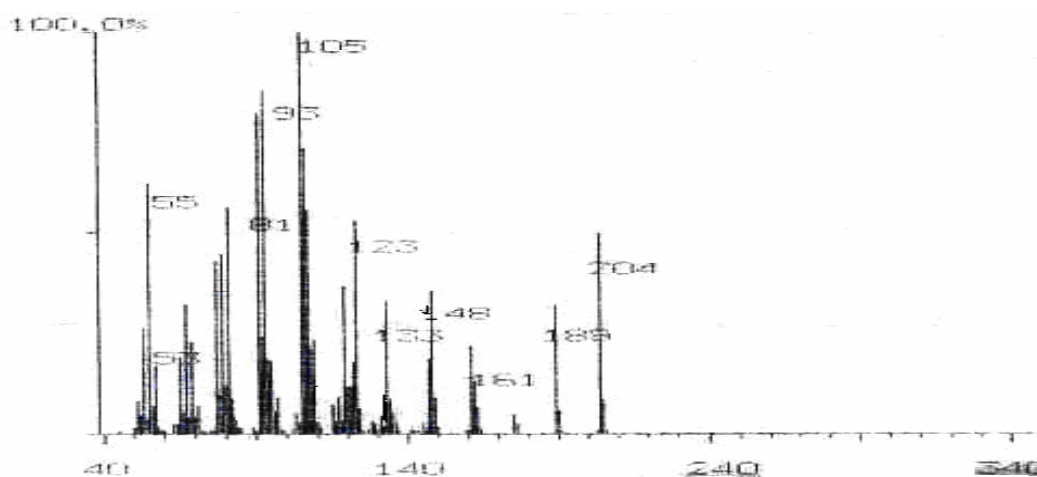


FIGURA 20 - Cromatograma CG/EM do composto Hex – 1/9 B da fração hexânica

O espectro de massas do hidrocarboneto Hex – 1/9 C, mostra o pico do íon molecular em  $m/z$  198 [ $M^+$  38 %], o pico base em  $m/z$  183 [ $M^+$  100%] e o fragmento

168 (35 %) (Figura 21), dados estes similares aos dados da literatura para o esqueleto de sesquiterpeno, necessitando de análises complementares para sua elucidação<sup>52, 54</sup>.

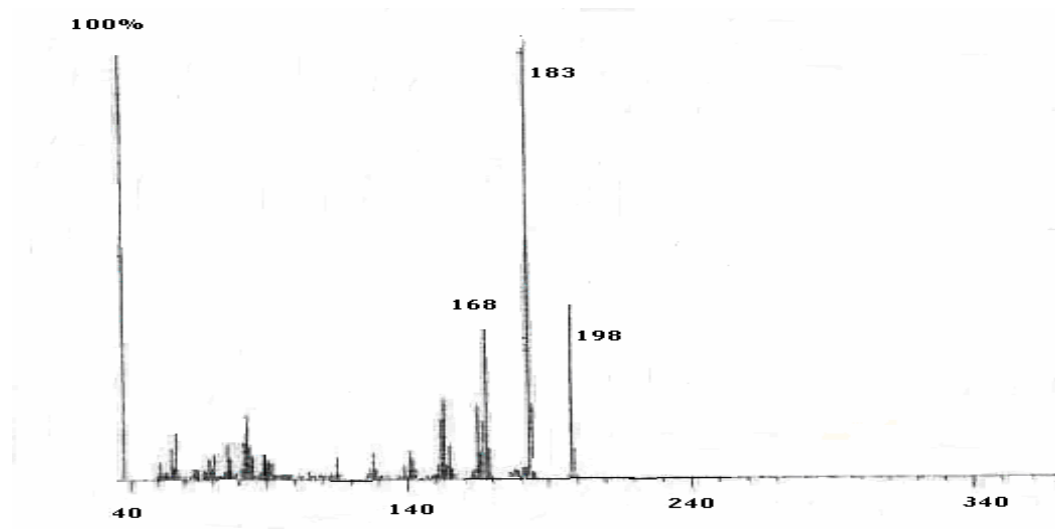


FIGURA 21 - Cromatograma CG/EM do composto Hex – 1/9 C da fração hexânica

O composto majoritário da mistura Hex – 1/9 D apresentou em seu espectro de massas, íon molecular em m/z 410 [ $M^+$  3 %] e pico base em m/z 95 [ $M^+$  100 %] e os demais fragmentos, em: 369 (4 %), 341 (9 %), 231 (6 %), 203 (11 %), 149 (51 %), 137 (66 %), 109 (59 %), 69 (100 %) (Figura 22). Os dados obtidos sugerem que se trata de um composto que possui um esqueleto esteroidal, cuja estrutura precisa ser confirmada por análises complementares<sup>57, 110, 111</sup>.

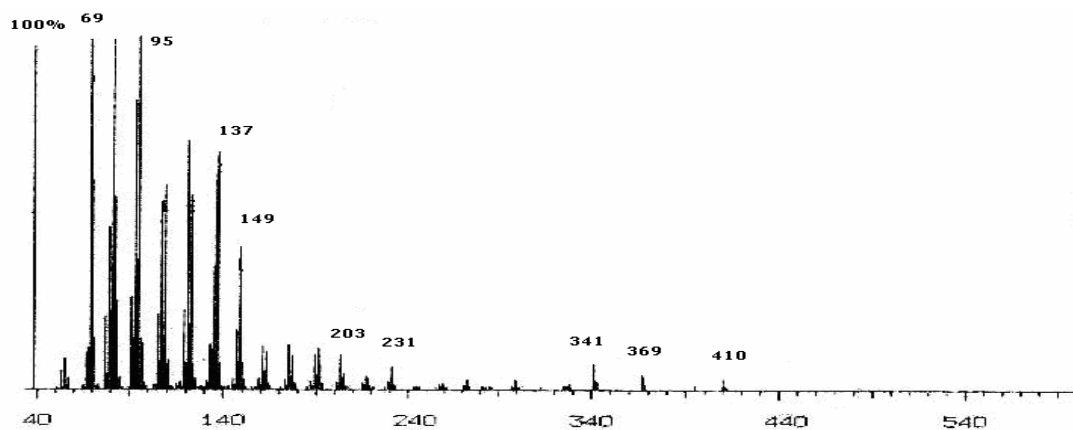


FIGURA 22 - Cromatograma CG/EM do composto Hex – 1/9 D da fração hexânica

### 5.3.2 Composto Hex -14/33

Por procedimento cromatográfico foi isolado da fração hexânica 713,6 mg do composto denominado de Hex – 14/33 e mais 219 mg do processo de purificação da mistura Hex - 31/81, perfazendo um total de 926 mg deste composto, o qual se apresentou na forma de cristal alongado e incolor, insolúvel em hexano, solúvel em diclorometano e ponto de fusão de 105 - 107°C. Estes cristais foram analisados por cromatografia em camada delgada comparativa utilizando-se padrão autêntico deste composto e cromatografia gasosa (Figura 23), conforme descrição na parte experimental. O cromatograma apresentou apenas um pico com tempo de retenção de 30,8 segundos.

Posteriormente, a estrutura química foi elucidada por técnicas espectroscópicas de RMN  $^1\text{H}$  e de  $^{13}\text{C}$ .

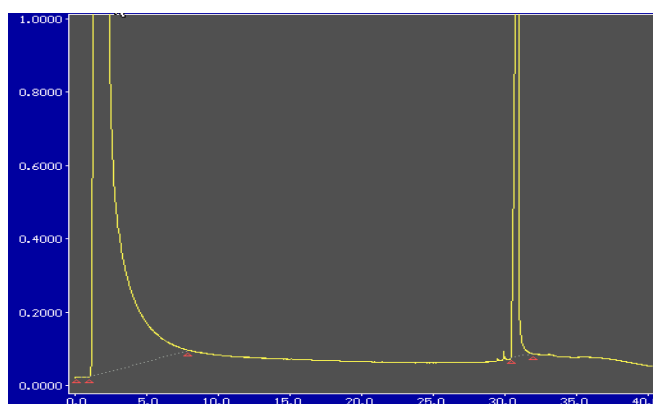


FIGURA 23 - Cromatograma por CG do composto Hex -14/33 da fração hexânica

O espectro de ressonância magnética nuclear de hidrogênio (Figura 24) demonstrou sinal com deslocamento químico ( $\delta$ ) na região espectral de 1,92  $\delta$  na forma de duplo dubleto (dd) relativo aos hidrogênios da metila –  $\text{H}_9$ , com constantes de acoplamentos ( $J$ ) de 6,6 e 1,5 Hertz (Hz) e simpleto (s) em 2,42  $\delta$  correspondendo aos hidrogênios da metila -  $\text{H}_9$ . Estes sinais encontram-se desprotegidos devido às metilas estarem próximas a insaturações. Um simpleto em 6,02  $\delta$  referente aos hidrogênios do grupo metilenodioxi. Sinais correspondendo a hidrogênios de olefina *trans* para  $\text{H}_7$ , em

6,51  $\delta$  como dupletto (d) ( $J = 15,6$  Hz) e  $H_{8'}$  em 6,23  $\delta$  como duplo quarteto (dq) ( $J = 6,6$  e  $15,7$  Hz). Os hidrogênios aromáticos aparecem em 6,92  $\delta$  ( $H_5$ , d,  $J = 8,6$  Hz), 7,26  $\delta$  multipletto (m) e em 7,36  $\delta$  ( $H_{5'}$ , d,  $J = 8,5$  Hz)

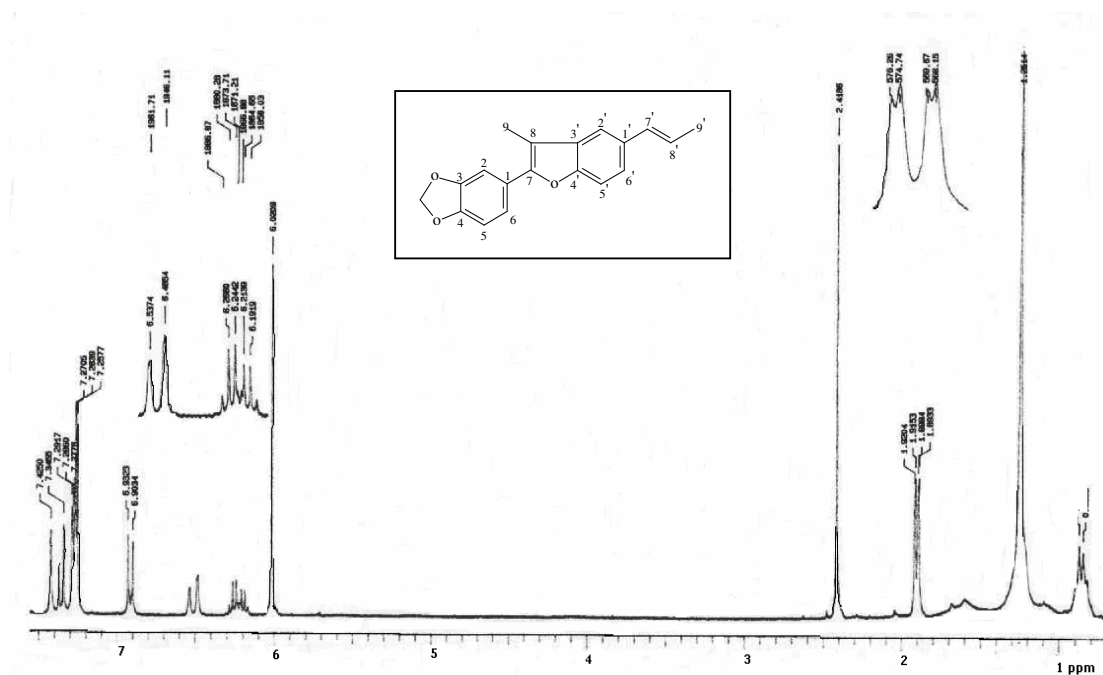


FIGURA 24 - Espectro de RMN  $^1\text{H}$  (300 MHz/  $\text{CDCl}_3$ ) do composto Hex – 14/33

No espectro de RMN  $^{13}\text{C}/\text{DEPT}$  (Figura 25) pode-se observar os deslocamentos químicos para as duas metilas em 9,47  $\delta$  (C-9') e 18,51  $\delta$  (C-9). O grupo metilenodioxí apresenta sinal em 101,2  $\delta$ . A presença de dupla ligação entre os átomos de carbono C-7 e C-8 é observada em 150,93 e 110,14  $\delta$ , respectivamente. O espectro apresentou deslocamentos químicos para os carbonos quaternários do anel furânico, C-3' e C-4' em 131,42 e 152,84  $\delta$  respectivamente. Os carbonos olefínicos, C-7' em 131,20  $\delta$  e C-8' em 124,24  $\delta$ . O carbono aromático C-1, esta ligado ao anel furânico e apresentou deslocamento químico em 125,48  $\delta$ . O carbono aromático C-1' encontra-se ligado ao grupo propenil, em  $\delta_{\text{C}}$  132,66  $\delta$ . Os demais carbonos aromáticos apresentaram deslocamentos químicos na região do espectro compreendido entre 107,13 a 147,89  $\delta$ .

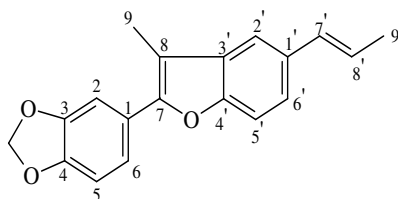


Os dados obtidos por RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}/\text{DEPT}$  foram comparados com os dados obtidos na literatura<sup>57</sup> para eupomatenóide -3 (**24**), os quais estão demonstrados na tabela 18 abaixo.

TABELA 18 – Comparação dos dados de RMN $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  do composto Hex-14/33 com literatura<sup>57</sup>

COMPOSTO HEX-14/33 ( $\text{CDCl}_3$ )			EUPOMATENÓIDE - 3 ( $\text{CDCl}_3$ )	
POSICÃO	$\delta_{\text{C}}$ PPM	$\delta_{\text{H}}$ PPM	$\delta_{\text{C}}$ PPM	$\delta_{\text{H}}$ PPM
C <sub>1</sub> (C)	125,48	-	125,43	-
C <sub>2</sub> (CH)	107,13	7,26 (m)	106,97	7,3 – 7,2 (m)
C <sub>3</sub> (C)	147,33	-	147,80	-
C <sub>4</sub> (C)	147,89	-	147,23	-
C <sub>5</sub> (CH)	108,56	6,92 (d, $J = 8,6$ Hz)	108,40	6,88(d, $J=8,5$ Hz)
C <sub>6</sub> (CH)	120,86	7,27 (m)	120,69	7,3 – 7,2 (m)
C <sub>7</sub> (C)	150,93	-	150,80	-
C <sub>8</sub> (C)	110,14	-	110,02	-
C <sub>9</sub> (CH <sub>3</sub> )	9,47	2,42 (s)	9,32	2,38 (s)
C <sub>1'</sub> (C)	132,66	-	132,58	-
C <sub>2'</sub> (CH)	116,13	7,42 (s)	116,06	7,39 (s)
C <sub>3'</sub> (C)	131,42	-	131,25	-
C <sub>4'</sub> (C)	152,84	-	152,77	-
C <sub>5'</sub> (CH)	110,65	7,36 (d, $J = 8,5$ Hz)	110,52	7,32 (d, 8,5)
C <sub>6'</sub> (CH)	122,32	7,26 (m)	122,21	7,3 – 7,2 (m)
C <sub>7'</sub> (CH)	131,20	6,51 (dd, $J = 6,6 - 15,6$ Hz)	131,25	6,48 (dd, 15,7)
C <sub>8'</sub> (CH)	124,24	6,23 (dq, $J = 15,7$ Hz)	124,00	6,22 (dd, 15,7)
C <sub>9'</sub> (CH <sub>3</sub> )	18,51	1,92 (dd, $J = 1,5 - 6,5$ Hz)	18,40	1,88 (d, 6,1)
OCH <sub>2</sub> O	101,24	6,01 (s)	101,14	5,98 (s)

NOTAS: Multiplicidade dos sinais: s = simpleto, d = duplete, dd = duplo duplete. Dq = duplo quarteto e m = multipeto;  $J$  = constante de acoplamento de Hertz; Solvente =  $\text{CDCl}_3$ ; TMS = padrão interno.



Eupomatenóide -3 (**24**)

Todos os valores para os deslocamentos químicos observados nos espectros de RMN $^1\text{H}$  e RMN  $^{13}\text{C}/\text{DEPT}$  coincidem com os dados relatados na literatura e nos permite identificar o composto Hex -14/33, como sendo a neolignana benzofurânica

denominada de Eupomatenóide-3 (**24**), a qual apresenta fórmula molecular  $[C_{19}H_{16}O_3]^{57}$  e a estrutura química encontra-se demonstrada acima. Esta neolignana, eupomatenóide-3 foi obtida anteriormente em outras espécies de *Piper*, mas foi a primeira vez isolada em *Piper solmsianum* C.DC. var. *solmsianum*.

### 5.3.3 Composto Hex – 51/81

A fração Hex-51/81(16,50 g) foi analisada por CG (Figura 26) e verificou-se tratar de uma mistura de 3 constituintes, a qual foi submetida a sucessivas cromatografias em coluna de sílica e eluição conforme descrição realizada na parte referente a metodologia. Este processo de purificação permitiu o isolamento dos compostos: Hex-14/33, Hex-51/81 e DCM-22. Do composto Hex-51/81, obteve-se 2.546 mg na forma de cristais alongados, incolores, insolúveis em hexano, solúveis em diclorometano e com ponto de fusão de 113 -114°C.

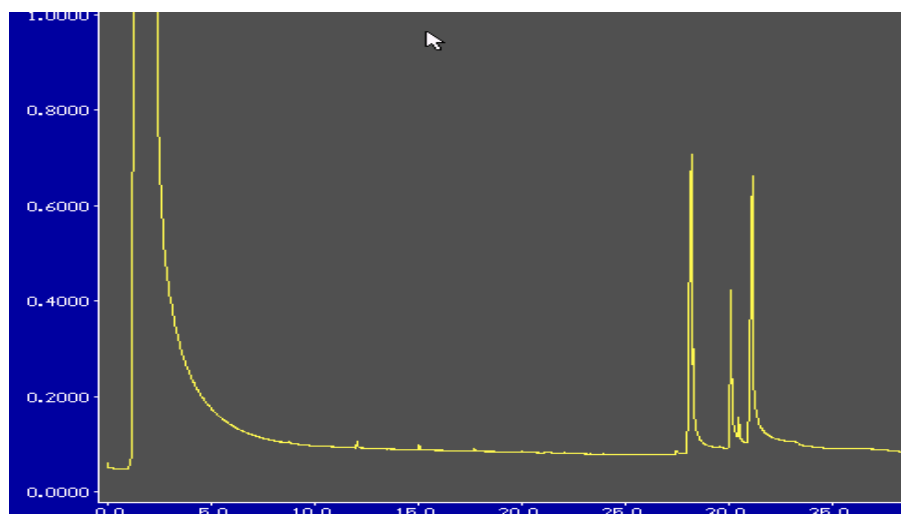


FIGURA 26 - Cromatograma por CG da mistura Hex -51/81 da fração hexânica

O espectro no IV (Figura 27) em pastilha de KBr apresentou uma banda de absorção em  $3.474\text{ cm}^{-1}$ , referente às vibrações de deformação axial do grupo OH. Observou-se bandas em  $2.970$ ,  $2.948$  e  $2.871\text{ cm}^{-1}$ , as primeiras resultam da

deformação axial assimétrica de C-H de metila e a terceira, origina-se da deformação axial simétrica de C-H de metila. Em  $2.925$  e  $2.845\text{ cm}^{-1}$ , bandas de deformação axial assimétrica e deformação axial simétrica respectivamente de metileno ( $\text{CH}_2$ ). O espectro apresentou absorções de fraca intensidade na região de  $1.650$  e  $1.612\text{ cm}^{-1}$  sugerindo deformação axial da ligação  $\text{C} = \text{C}$ . Em  $1.516$  e  $1.431\text{ cm}^{-1}$  banda de absorção intensa referente à deformação angular no plano de  $\text{C} - \text{H}$  do anel aromático e em  $1.277$ ,  $1.262$ ,  $1.229$ ,  $1.204\text{ cm}^{-1}$  de deformação axial das ligações carbono-carbono do anel. O espectro no IV apresentou em  $1.099\text{ cm}^{-1}$  uma absorção intensa relativa a deformação axial assimétrica de  $\text{C-O-C}$  e em  $959\text{ cm}^{-1}$  banda de absorção intensa de deformação angular fora do plano das ligações  $\text{C-H}$  do anel aromático.

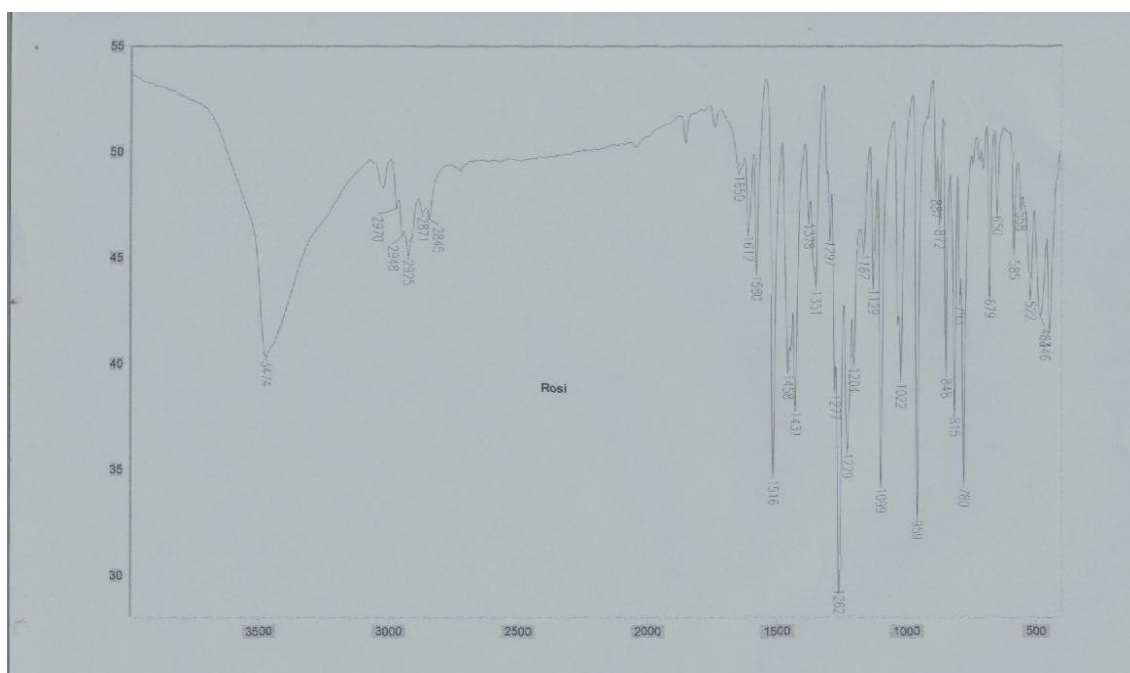


FIGURA 27 - Espectro no IV (KBr) do composto Hex – 51/81

O espectro de RMN  $^1\text{H}$  (Figura 28) apresentou sinal com deslocamento químico na região espectral de  $1,90\text{ }\delta$  na forma de duplo duplete (dd) relativo aos hidrogênios da metila  $\text{C-9'}$  ( $J = 1,5$  e  $6,5\text{ Hz}$ ) e simpleto em  $2,43\text{ }\delta$  correspondendo aos hidrogênios



da metila C-9'. Observou-se um simpleto intenso em 3,98  $\delta$  referente aos hidrogênios da metoxila e outro simpleto em 5,75  $\delta$  de hidrogênio ligado a OH. Dois sinais na forma de duplo duplo correspondendo aos hidrogênios de olefina *trans* do C-7' em 6,52  $\delta$  ( $J = 15,7$  e  $1,5$  Hz) e do C-8' em 6,23  $\delta$  ( $J = 15,7$  e  $6,5$  Hz). Os hidrogênios aromáticos aparecem em 7,01  $\delta$  (C-5, d,  $J = 8,2$  Hz), 7,26  $\delta$  (s), 7,28  $\delta$  (dd,  $J = 3,0$  e  $5,0$  Hz), 7,31  $\delta$  (m), 7,37  $\delta$  (d,  $J = 8,3$  Hz) e 7,43  $\delta$  (d,  $J = 1,4$  Hz) os quais encontram-se ligados aos carbonos C-5, C-2', C-5', C-6 e C-2 respectivamente.

Estes dados de RMN<sup>1</sup>H foram comparados com os dados registrados na literatura<sup>57</sup>, os quais estão demonstrados na tabela 19 abaixo.

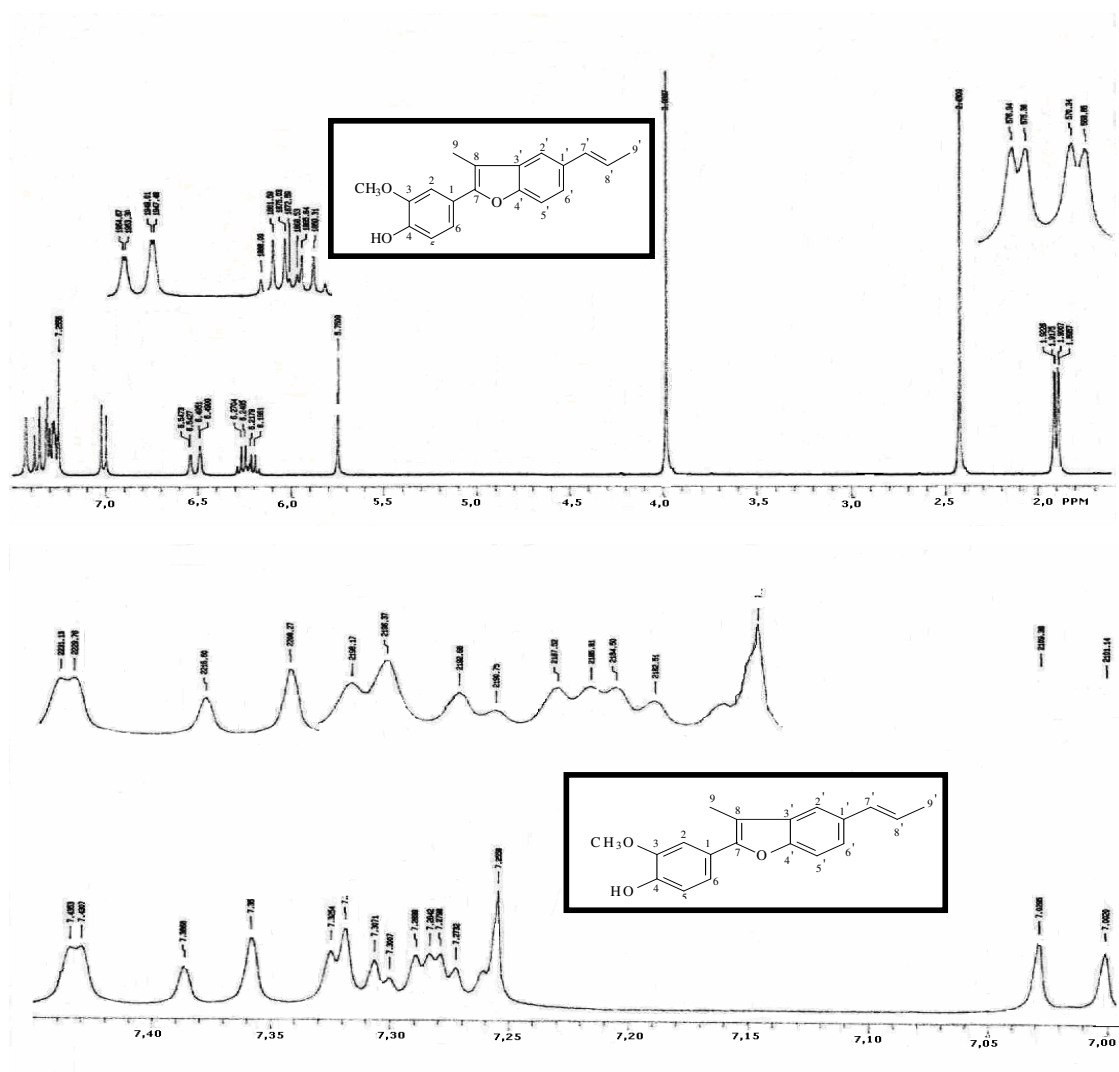


FIGURA 28 - Espectro de RMN<sup>1</sup>H (300 MHz/ CDCl<sub>3</sub>) do composto Hex – 51/81

O espectro de RMN<sup>13</sup>C/DEPT (Figuras 29 e 30) demonstrou os deslocamentos químicos em 9,45 e 18,51 referentes às metilas C-9 e 9' respectivamente. Na região espectral de 56,02  $\delta$  observou-se o sinal relativo ao grupo metoxila. Os sinais referentes aos carbonos olefinicos C-7 e C-8 encontram-se em 151,20 e 109,81  $\delta$ , já para C-7' e C-8' encontram-se em 131,21 e 124,21  $\delta$ , respectivamente. O espectro apresentou deslocamentos químicos para os carbonos quaternários do anel furânico, C-3' em 131,50  $\delta$  e C-4' em 152,83  $\delta$ . O carbono aromático C-1, encontra-se ligado ao anel furânico e apresentou deslocamento químico na região espectral de 125,48  $\delta$ . O carbono aromático C-1' encontra-se ligado ao grupo propenil, em 123,82  $\delta$ . O carbono C-4 ligado à função OH, apresentou deslocamento químico em 145,63  $\delta$ .

O espectro de RMN <sup>13</sup>C/DEPT nos mostra as correlações entre <sup>1</sup>H - <sup>13</sup>C, nos permitindo distinguir os sinais de CH<sub>3</sub> e CH voltado para baixo e os sinais de CH<sub>2</sub> voltado para cima e ausência de sinal no espectro para os carbonos quaternários.

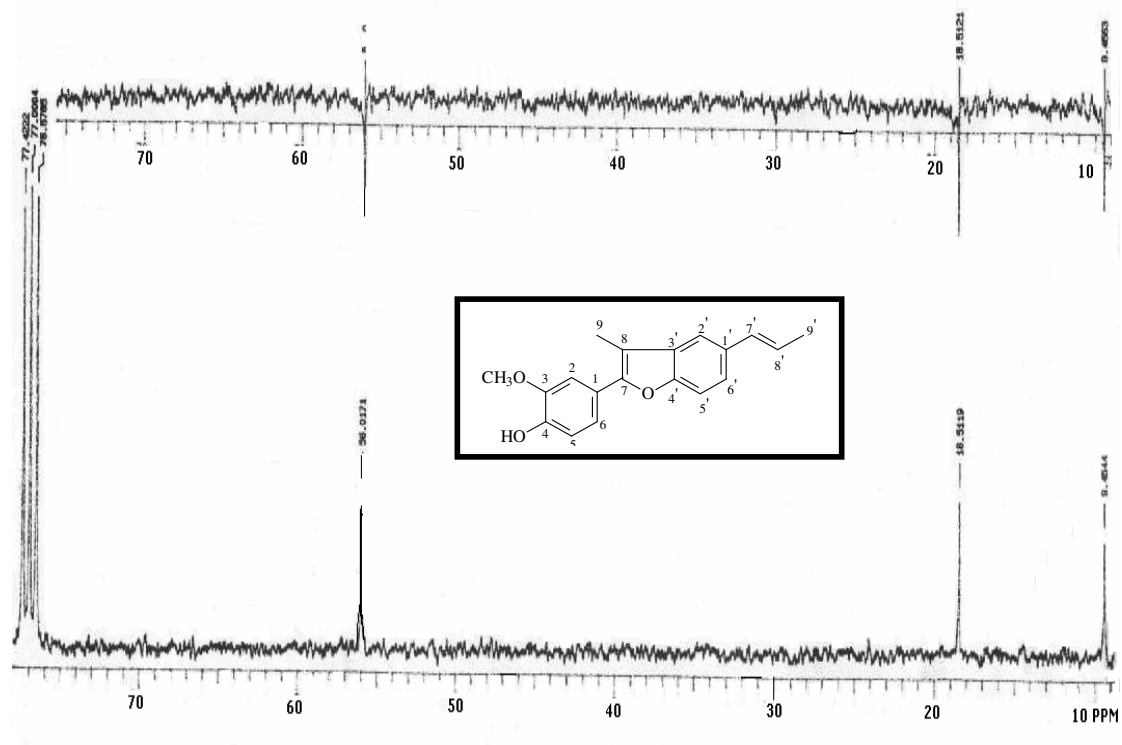


FIGURA 29 - Espectro de RMN <sup>13</sup>C do (75 MHz/CDCl<sub>3</sub>) composto Hex – 51/81

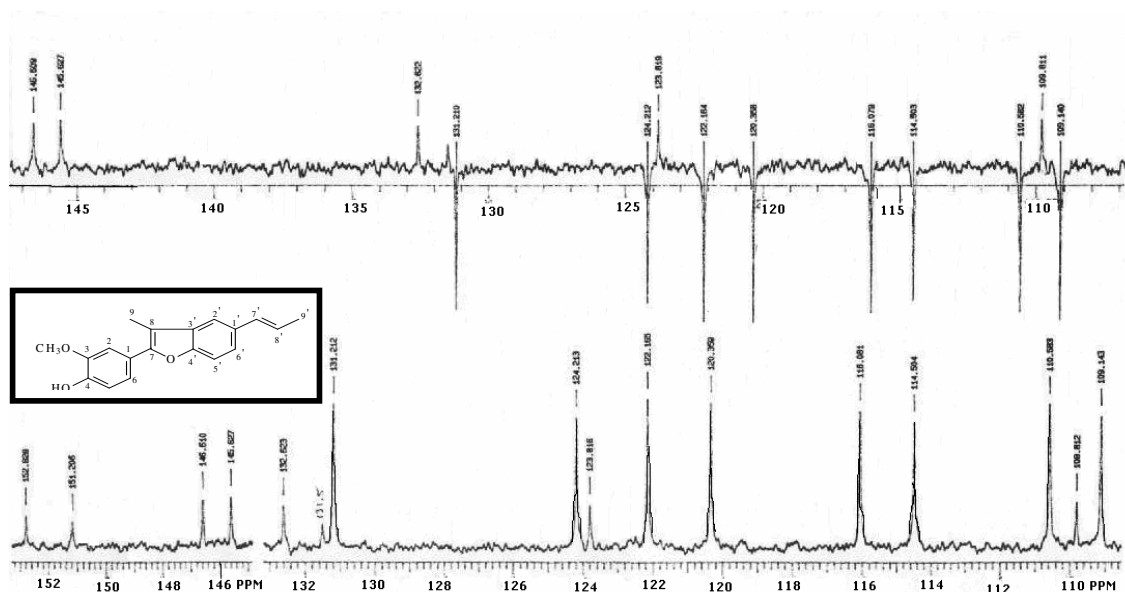


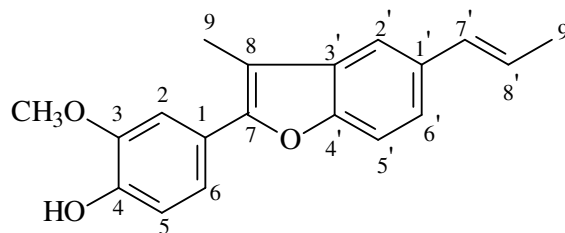
FIGURA 30 - Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  (75 MHz/ $\text{CDCl}_3$ ) do composto Hex – 51/81

Estes dados de RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  foram comparados com os dados registrados na literatura<sup>57</sup>, os quais estão demonstrados na tabela 19 abaixo.

TABELA 19 – Comparação dos dados de RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  do composto Hex-51/81 com literatura<sup>57</sup>

COMPOSTO HEX-51/81 ( $\text{CDCl}_3$ )			EUPOMATENÓIDE – 5 ( $\text{CDCl}_3$ ) <sup>57</sup>	
POSICÃO	$\delta_{\text{C}}$ PPM	$\delta_{\text{H}}$ PPM	$\delta_{\text{C}}$ PPM	$\delta_{\text{H}}$ PPM
C <sub>1</sub>	123,82	-	125,00	-
C <sub>2</sub>	109,14	7,43 (d, $J = 1,4$ Hz)	109,20	7,32 (d, $J = 2,0$ Hz)
C <sub>3</sub>	146,61	-	146,63	-
C <sub>4</sub>	145,63	5,75 (s)	145,65	-
C <sub>5</sub>	114,50	7,01 (d, $J = 8,2$ Hz)	114,51	7,02 (d, $J = 8,0$ Hz)
C <sub>6</sub>	120,36	7,37 (d, $J = 8,3$ Hz)	120,36	7,29 (dd, $J = 2,0 - 8,0$ Hz)
C <sub>7</sub>	151,20	-	148,81	-
C <sub>8</sub>	109,81	-	110,00	-
C <sub>9</sub>	9,45	2,43 (s)	9,41	2,42 (s)
C <sub>1'</sub>	132,62	-	132,63	-
C <sub>2'</sub>	116,08	7,26 (s)	116,08	7,43 (d, $J = 2,4$ Hz)
C <sub>3'</sub>	131,50	-	131,23	-
C <sub>4'</sub>	152,83	-	153,00	-
C <sub>5'</sub>	110,58	7,31 (m)	110,57	7,37 (d, $J = 8,4$ Hz)
C <sub>6'</sub>	122,17	7,28 (dd, $J = 3,0 - 5,0$ Hz)	122,17	7,27 (dd, $J = 2,4 - 8,4$ Hz)
C <sub>7'</sub>	131,21	6,52 (dd, $J = 1,5 - 15,7$ Hz)	131,23	6,52 (d, $J = 15,2$ Hz)
C <sub>8'</sub>	124,21	6,23 (dd, $J = 6,5 - 15,7$ Hz)	124,17	6,23 (dd, $J = 6,4 - 15,2$ Hz)
C <sub>9'</sub>	18,51	1,90 (dd, $J = 1,5 - 6,5$ Hz)	18,47	1,90 (d, $J = 6,4$ Hz)
OCH <sub>3</sub>	56,02	3,98 (s)	56,01	3,98 (s)

NOTAS: Multiplicidade dos sinais: s = simples, d = duplo, dd = duplo duplo e m = multiplo;  $J$  = constante de acoplamento em Hertz; Solvente =  $\text{CDCl}_3$ ; TMS = padrão interno.

Eupomatenóide-5 (**16**)

Os dados espectrais obtidos por IV, RMN<sup>1</sup>H, RMN<sup>13</sup>C/DEPT e o ponto de fusão coincidem com os dados de literatura, os quais nos permitiram identificar o composto Hex- 51/81 (**16**) como sendo a neolignana benzofurânica denominada de Eupomatenóide -5, com fórmula molecular [C<sub>19</sub>H<sub>18</sub>O<sub>3</sub>], cuja estrutura química encontra-se demonstrada acima.

Esta neolignana foi isolada anteriormente em outras espécies de *Piper*, mas foi a primeira vez isolada em *Piper solmsianum* C.DC. var. *solmsianum*, portanto este dado é inédito.

A literatura nos revela que as neolignanas benzofurânicas representam uma classe de compostos com uma variedade de atividades biológicas, incluindo anti-PAF, antifúngica, antibacteriana e inseticida. O eupomatenóide-5 é uma neolignanana benzofurânica com atividade antimicrobiana, o qual desempenha uma boa atividade contra as bactérias gram-positivas *Staphylococcus aureus* e *Bacillus subtilis*<sup>64, 81, 82</sup>.

#### 5.3.4 Composto DCM – 22

Através do processo de purificação da mistura Hex-51/81, conforme descrição anterior foi possível o isolamento de 918 mg do composto DCM-22, o qual se apresentou na forma de cristais alongados e incolores, solúveis em diclorometano e clorofórmio, insolúvel em hexano e com ponto de fusão de 131°C-133°C. Posteriormente, foi analisado por CCD e CG conforme descrição em material e métodos (Figura 31) e submetido à análises espectroscópicas de RMN <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C/DEPT.

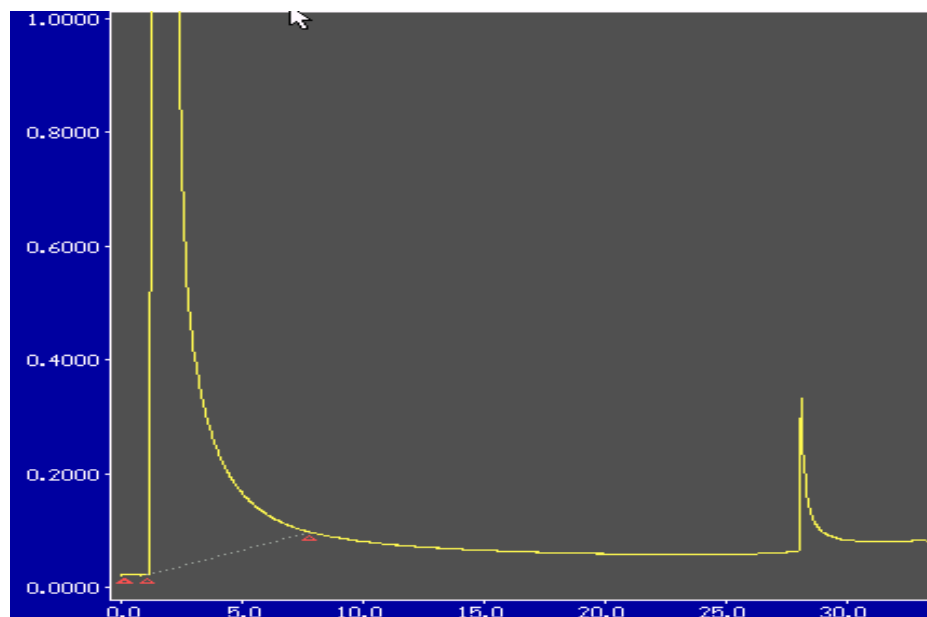


FIGURA 31 - Cromatograma por CG da mistura DCM - 22

O espectro de RMN  $^1\text{H}$  do composto DCM-22 (Figuras 32 e 33) apresentou sinal de deslocamento químico em 1,84  $\delta$  (dd,  $J = 6,6$  e  $1,6$  Hz) correspondendo aos hidrogênios da metila H-9. A maior diferença espectral entre o eupomatenóide-5 e o DCM-22 é observada entre os carbonos C-7 e C-8, pois o DCM-22 é o 7,8-diidro. Os sinais são encontrados em 5,07  $\delta$  (d,  $J = 8,9$  Hz) e 3,38  $\delta$  (m) respectivamente. Os dois hidrogênios olefínicos *trans*, apresentaram os seguintes deslocamentos químicos: 6,36  $\delta$  (dd,  $J = 1,6$  e  $15,7$  Hz) H-7', 6,09  $\delta$  (dd,  $J = 6,6$  e  $15,7$  Hz) H - 8' e 1,38  $\delta$  (d,  $J = 6,8$  Hz) H-9'. Observou-se 3 sinais de hidrogênios aromáticos em: 7,13  $\delta$  (s), 6,76  $\delta$  (d,  $J = 8,4$  Hz) e 7,10  $\delta$  (d,  $J = 1,68$  Hz) referentes aos hidrogênios H-2', H-5' e H - 6' respectivamente. Os demais hidrogênios aromáticos H-2/H-6 em 7,28 (d,  $J = 8,5$  Hz) e H-3/H-5 6,80  $\delta$  (d,  $J = 8,6$  Hz). Estes dados de RMN $^1\text{H}$  foram comparados com os dados registrados nas literaturas<sup>57,66</sup>, os quais estão demonstrados na tabela 20, abaixo.



O espectro de RMN  $^{13}\text{C}/\text{DEPT}$  (Figuras 34 e 35) exibiu os deslocamentos químicos em 17,76 e 18,39  $\delta$  referentes às metilas C-9 e C-9' respectivamente. A maior diferença espectral entre o eupomatenóide-5 e o DCM-22 é a presença de dupla ligação entre os átomos de carbono C-7 e C-8 representado pelos sinais de  $\delta_{\text{C}}$  151,20 e 109,81  $\delta$  para o eupomatenóide-5 e os sinais 92,63 e 45,13  $\delta$  para o DCM-22 respectivamente. Observou-se no espectro sinais para os carbonos quaternários do anel furânico, C-3' em 132,69 e C-4' em 158,12  $\delta$ . Os carbonos olefínicos, C-7' em 130,69  $\delta$  e C-8' em 123,06  $\delta$ . O carbono aromático C-1, encontra-se ligado ao anel furânico e apresentou deslocamento químico na região espectral de 131,27  $\delta$ . O carbono aromático C-1' encontra-se ligado ao grupo propenil, em 132,32  $\delta$ . O carbono C-4 ligado à função OH, apresentou deslocamento químico em 155,60  $\delta$ .

O espectro de RMN  $^{13}\text{C}/\text{DEPT}$  nos mostra as correlações entre  $^1\text{H}$  -  $^{13}\text{C}$ , nos permitindo distinguir os picos de  $\text{CH}_3$  e  $\text{CH}$  voltado para baixo e o picos de  $\text{CH}_2$  voltado para cima e ausência de sinal no espectro para os carbonos quaternários. Estes dados de RMN  $^{13}\text{C}$  foram comparados com os dados registrados na literatura<sup>57</sup>, os quais estão demonstrados na tabela 20, abaixo.

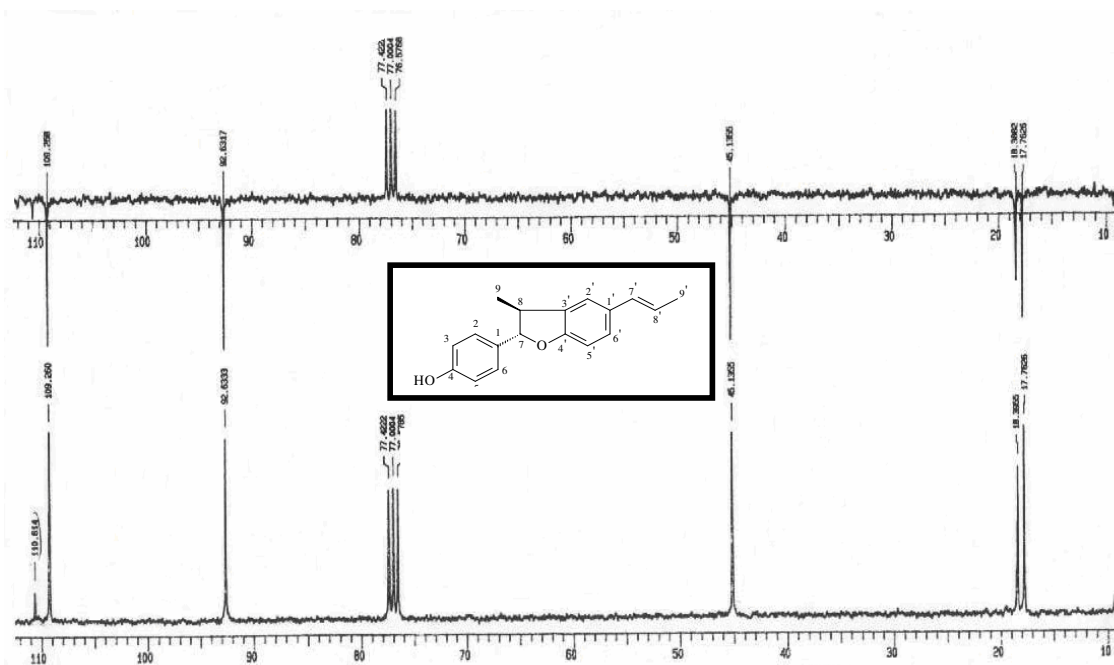


FIGURA 34 - Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  (75 MHz/ $\text{CDCl}_3$ ) do composto DCM - 22

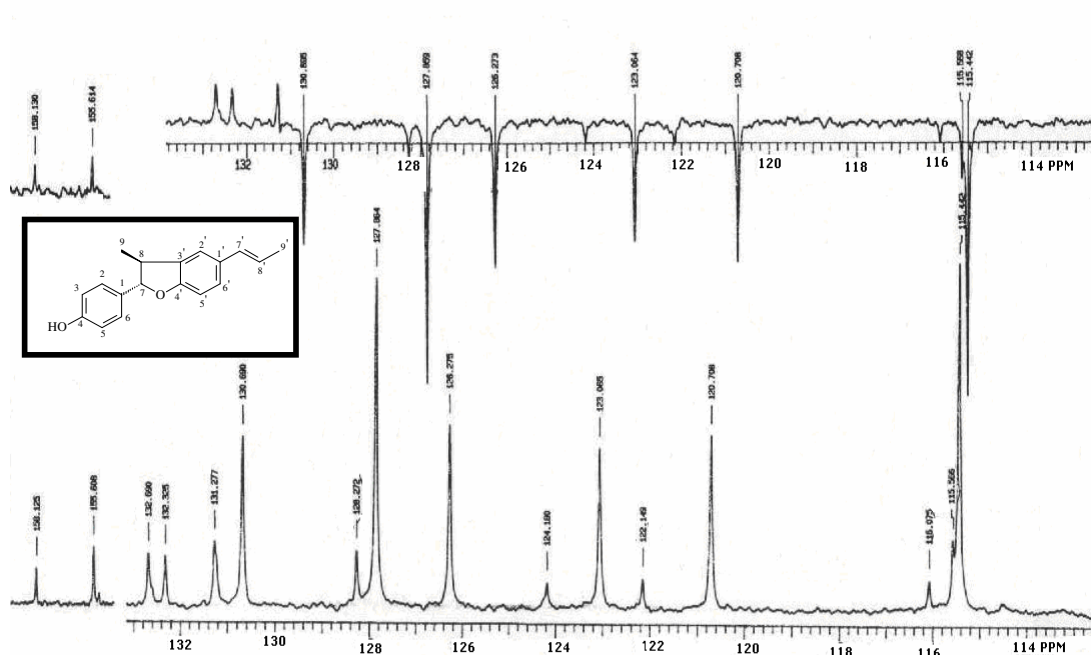


FIGURA 35 - Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  (75 MHz/ $\text{CDCl}_3$ ) do composto DCM - 22

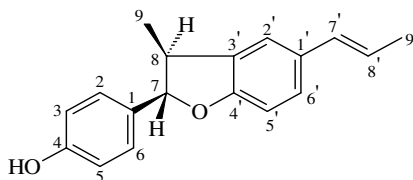
TABELA 20 – Comparação dos dados de RMN $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  do composto DCM-22 com literatura<sup>57</sup>

COMPOSTO DCM-22 ( $\text{CDCl}_3$ )			CONOCARPANO <sup>57</sup> ( $\text{CDCl}_3$ )	
POSICÃO	$\delta_{\text{C}}$ PPM	$\delta_{\text{H}}$ PPM	$\delta_{\text{C}}$ PPM	$\delta_{\text{H}}$ PPM
C <sub>1</sub> (C)	131,27	-	131,18	-
C <sub>2</sub> (CH)	127,86	7,28(d, $J = 8,5$ Hz)	127,78	7,26 (d, $J = 8,2$ Hz)
C <sub>3</sub> (CH)	115,4	6,80(d, $J = 8,6$ Hz)	115,44	6,79 (d, $J = 8,2$ Hz)
C <sub>4</sub> (C)	155,60	-	155,96	-
C <sub>5</sub> (CH)	115,44	6,80 (d, $J = 8,6$ Hz)	115,44	6,79 (d, $J = 8,2$ Hz)
C <sub>6</sub> (CH)	127,86	7,28 (d, $J = 8,5$ Hz)	127,78	7,26 (d, $J = 8,2$ Hz)
C <sub>7</sub> (CH)	92,63	5,07 (d, $J = 8,9$ Hz)	92,68	5,08 (d, $J = 8,8$ Hz)
C <sub>8</sub> (CH)	45,13	3,38 (m)	44,94	3,74 (m)
C <sub>9</sub> (CH <sub>3</sub> )	17,76	1,38 (d, $J = 6,8$ Hz)	17,75	1,36 (d, $J = 6,6$ Hz)
C <sub>1'</sub> (C)	132,32	-	131,97	-
C <sub>2'</sub> (CH)	120,70	7,13(s)	120,67	7,2 – 7,0
C <sub>3'</sub> (C)	132,69	-	132,27	-
C <sub>4'</sub> (C)	158,12	-	157,93	-
C <sub>5'</sub> (CH)	109,26	6,76 (d, $J = 8,4$ Hz)	109,14	6,8-6,6
C <sub>6'</sub> (CH)	126,27	7,10 (d, $J = 1,68$ Hz)	126,17	7,2-7,0
C <sub>7'</sub> (CH)	130,69	6,36 (dd, $J = 1,6 - 15,7$ Hz)	130,61	6,34 (d, $J = 15,8$ Hz)
C <sub>8'</sub> (CH)	123,06	6,09 (dd, $J = 6,6 - 15,7$ Hz)	122,93	6,3-6,0 (m)
C <sub>9'</sub> (CH <sub>3</sub> )	18,39	1,84 (dd, $J = 1,6 - 6,6$ Hz)	18,33	1,84 (d, $J = 6,6$ Hz)

NOTAS: Multiplicidade dos sinais: s = simpeto, d = dupeto, dd = duplo dupeto e m = multipeto;  $J$  = constante de acoplamento em Hertz; Solvente =  $\text{CDCl}_3$ ; TMS = padrão interno.



Os dados de RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  estão de acordo com os dados descritos na literatura, que nos permitiram identificar o composto DCM-22 como sendo a neolignana benzofurânica, com fórmula molecular  $[\text{C}_{18}\text{H}_{18}\text{O}_2]$ , denominada de conocarpano (**15**), cuja estrutura química encontra-se demonstrada abaixo.



Conocarpano (**15**)

Para a espécie vegetal *Piper solmsianum* C.DC. var. *solmsianum* nenhuma referência foi encontrada sobre o isolamento de tal composto, constituindo-se em um dado inédito.

A literatura nos revela que o conocarpano possui atividade antibacteriana, citotóxica, antiproliferativa, antioxidante, fotoprotetor, antiangiogênica e inseticida<sup>69, 81, 112</sup>.

Dado importante a ser ressaltado diz respeito à escassez de trabalhos científicos direcionados a avaliação do potencial farmacológicos das neolignanas isoladas na presente pesquisa: o eupomatenóide-3, eupomatenóide-5 e o conocarpano.

#### 5.4 FRAÇÃO DICLOROMETANO

A pesquisa química com a fração diclorometano levou ao isolamento de 518,8 mg do composto DCM-22, o qual foi submetido às análises espectroscópicas de RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}/\text{DEPT}$ , determinação do ponto de fusão e comparação dos dados obtidos com os dados da literatura. Todas estas análises permitiram a elucidação da estrutura química do DCM-22, o qual foi identificado como sendo o conocarpano. Esta neolignana benzofurânica foi isolado também na fração hexânica e os dados espectroscópicos já foram relatados anteriormente. Parte deste material foi enviado

para estudos biológicos e outra parte foi direcionado a modificações estruturais, como tentativa de se obter derivados do conocarpano com maior potencial bioativo e controle químico sazonal.

## 5.5 IDENTIFICAÇÃO DOS COMPOSTOS ISOLADOS DA FRAÇÃO ACETATO DE ETILA

A investigação química com a fração acetato de etila (6,6 g), levaram ao isolamento dos compostos AE - 19/21 (**58**), AE - 31/75 (**56**) e AE - 49/65 (**57**), os quais foram submetidos a análises de espectroscópicas de RMN  $^1\text{H}$  e RMN  $^{13}\text{C}$  para a elucidação de suas estruturas químicas, descritas abaixo.

### 5.5.1 Identificação do Composto AE - 19/21

O composto AE-19/21 foi isolado da fração AE após CC por procedimentos cromatográficos, obtendo-se 12,3 mg de um sólido amarelo amorfo, solúvel em piridina e insolúvel em acetona, acetato de etila, metanol e etanol, com ponto de fusão de 295 - 296°C <sup>113</sup>. A estrutura química do composto AE-19/21 foi confirmada através de técnicas espectroscópicas de IV, RMN $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ /DEPT e por comparação com dados da literatura, os quais estão demonstrados e descritos abaixo<sup>113</sup>.

O espectro no infravermelho (Figura 36), pastilha em KBr apresentou uma banda de absorção larga na região de 3.261  $\text{cm}^{-1}$  relativa as vibrações de deformação axial OH. Em 1.667  $\text{cm}^{-1}$  uma banda intensa de deformação axial de C = O, característica de carbonila conjugada. Na região de 1606, 1590 e 1501  $\text{cm}^{-1}$  observaram-se várias bandas de deformações axiais C = C do anel aromático. As absorções em 1.376, 1.341, 1.292, 1.246, 1.223, 1.209, 1.191 e 1.180  $\text{cm}^{-1}$  são referentes às deformações angulares no plano das ligações C-H do anel e em 831  $\text{cm}^{-1}$  banda intensa relativa à deformação angular fora do plano das ligações C-H do anel. A banda intensa em 1.161  $\text{cm}^{-1}$  esta relacionada com as vibrações de deformação axial do sistema C-O-C.

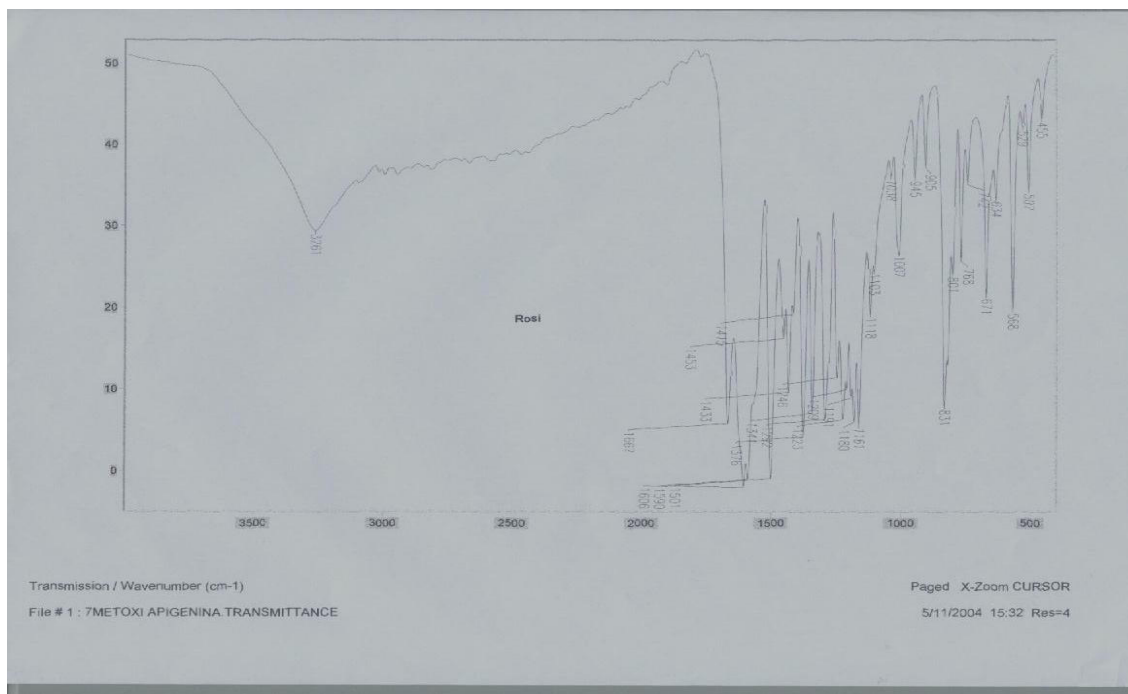


FIGURA 36 - Espectro no IV (KBr) do composto AE – 19/ 21

Pelo espectro de RMN  $^1\text{H}$  (Figura 37) observou-se absorções na região de prótons aromáticos 4 dupletos em 7,90  $\delta$  ( $J = 8,8$  Hz), 6,94  $\delta$  ( $J = 8,8$  Hz), 6,81  $\delta$  ( $J = 2,1$  Hz) e 6,36  $\delta$  ( $J = 2,1$  Hz) atribuídos respectivamente aos prótons H – 2'/6', H-3'/5', H-8 e H-6. O simpleto em 3,78  $\delta$  foi atribuído ao grupamento metoxila. Outros deslocamentos químicos observados foram 2 simpletos em 8,74  $\delta$  atribuído ao hidrogênio de OH ligada ao carbono C-5 e em 7,58  $\delta$  atribuído ao hidrogênio de OH ligada ao carbono C-4'. Os deslocamentos químicos estão indicados na tabela 21.

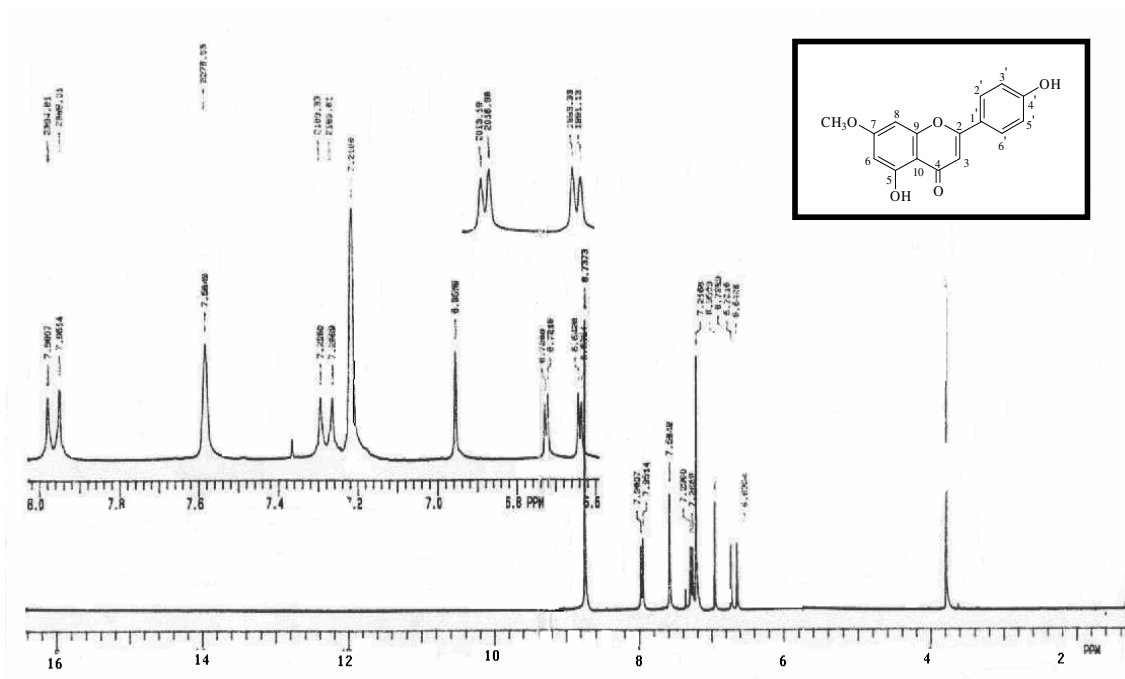


FIGURA 37 - Espectro de RMN  $^1\text{H}$  (300 MHz/ $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ ) do composto AE – 19/ 21

Os dados dos deslocamentos químicos do espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  (Figura 38) estão de acordo com a estrutura 5,4'-diidroxi -7-metoxiflavona (**58**) e com os dados descritos por LIN (2001)<sup>113</sup> para este composto. Os deslocamentos químicos estão indicados na tabela 21<sup>113,114</sup>.

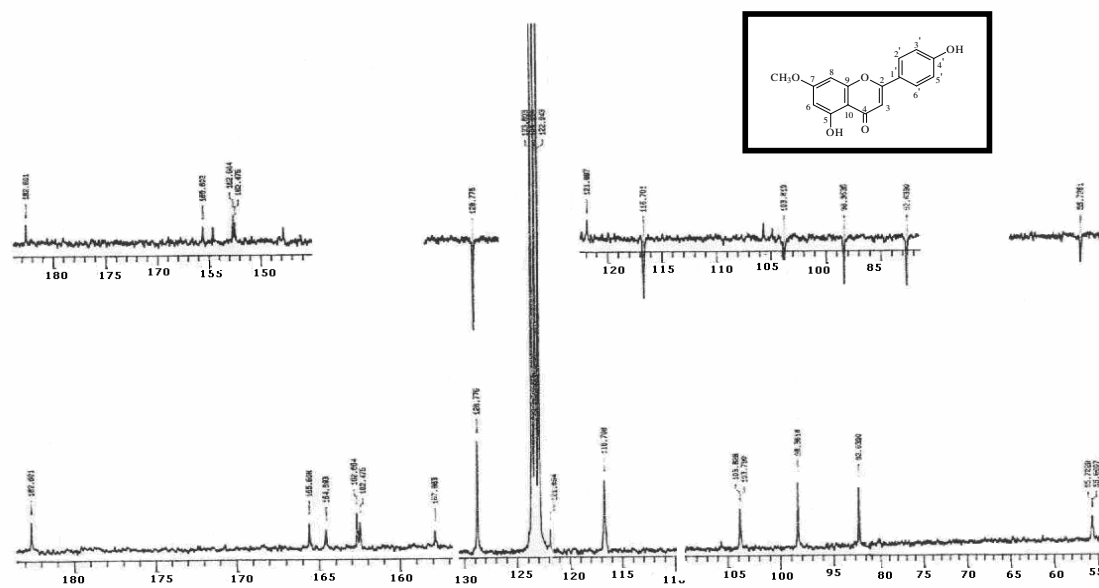


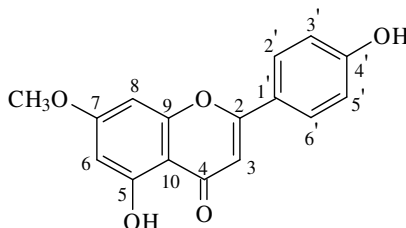
FIGURA 38 - Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  (75 MHz/  $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ ) do composto AE – 19/ 21

TABELA 21 – Comparação dos dados de RMN<sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C do composto AE-19/21 com literatura<sup>113</sup>

COMPOSTO AE – 19/21 C <sub>5</sub> D <sub>5</sub> N			5,4'-DIIDROXI-7-METOXIFLAVONA DMSO – <i>d</i> <sub>6</sub>	
POSICÃO	δ <sub>C</sub> PPM	δ <sub>H</sub> PPM	δ <sub>C</sub> PPM	δ <sub>H</sub> PPM
C <sub>1</sub> (O)	-	-	-	-
C <sub>2</sub> (C)	164,6	-	164,2	-
C <sub>3</sub> (CH)	103,8	6,66 (s)	103,1	6,75 (s)
C <sub>4</sub> (C)	182,6	-	180,2	-
C <sub>5</sub> (C)	162,5	-	161,4	-
C <sub>6</sub> (CH)	98,3	6,64 (d, <i>J</i> = 1,8 Hz)	98,1	6,36 (d, <i>J</i> = 1,8 Hz)
C <sub>7</sub> (C)	165,6	-	165,2	-
C <sub>8</sub> (CH)	92,8	6,72 (d, <i>J</i> = 2,1 Hz)	92,8	6,82 (d, <i>J</i> = 2,1 Hz)
C <sub>9</sub> (C)	157,8	-	157,3	-
C <sub>10</sub> (C)	103,8	-	104,7	-
C <sub>1'</sub> (C)	121,9	-	121,1	-
C <sub>2'</sub> (CH)	128,7	7,90 (d, <i>J</i> = 8,8 Hz)	128,7	7,94 (d, <i>J</i> = 8,8 Hz)
C <sub>3'</sub> (CH)	116,7	7,28 (d, <i>J</i> = 8,7 Hz)	116,1	6,93 (d, <i>J</i> = 8,7 Hz)
C <sub>4'</sub> (C)	162,6	-	161,2	-
C <sub>5'</sub> (CH)	116,7	7,28 (d, <i>J</i> = 8,7 Hz)	116,1	6,93 (d, <i>J</i> = 8,7 Hz)
C <sub>6'</sub> (CH)	128,7	7,90 (d, <i>J</i> = 8,8 Hz)	128,7	7,94 (d, <i>J</i> = 8,8 Hz)
OCH <sub>3</sub>	55,7	3,78 (s)	56,1	3,87 (s)
OH – 5	-	8,74 (s)	-	12,92 (s)
OH – 4'	-	7,58 (s)	-	10,31 (s)

NOTAS: Multiplicidade dos sinais: s = simpleto, d = duplete, dd= duplo duplete e m = multiplete; *J* = constante de acoplamento em Hz, TMS = padrão interno, Solvente = C<sub>5</sub>D<sub>5</sub>N (7,22 δ).

Após análise dos dados de RMN <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C obtidos na presente pesquisa e a comparação dos dados com os da literatura, foi possível identificar o composto AE – 19/21 como sendo o flavonóide 7-metoxi-apigenina<sup>113,114</sup> ou Genkwanina (**58**), cuja estrutura química esta demonstrada abaixo.



7- metoxi-apigenina<sup>114</sup> - Genkwanina (**58**)

Os testes de atividade biológica realizados com esta flavona têm demonstrado que apresenta ação antimutagênica e antibacteriana<sup>113</sup>

Durante a revisão bibliográfica verificou-se que a genkwanina é uma flavona encontrada nos gêneros *Baccharis* e *Dalphnis* e a literatura ressalta que o número de flavonas isoladas de *Piper* é relativamente reduzido<sup>115, 116</sup>. Neste contexto, não encontrou-se nenhum relato do isolamento da genkwanina em *Piper solmsianum* C.DC. var. *solmsianum* sendo portanto, isolada pela primeira vez nesta espécie vegetal.

### 5.5.2 Isolamento do composto AE-31/75

O composto AE-31/75 foi isolado da fração acetato de etila após procedimentos cromatográficos com eluição com solventes na forma de gradiente de polaridade crescente: clorofórmio e metanol, obtendo-se 972 mg de um sólido amorfo amarelo-claro, solúvel em uma mistura de solventes acetato de etila e metanol (1:1), o qual foi analisado por CCD. O composto revelou reação positiva com cloreto férrico a 3 %, sugerindo ser um composto fenólico, com ponto de fusão 262-264°C<sup>117</sup>. As informações que levaram à elucidação da estrutura do composto AE- 31/75 foram obtidas das análises espectroscópicas no IV, RMN <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C cujos espectros (Figuras 39,40,41). Amostras deste material foram enviadas para avaliação do seu potencial como agente antibacteriano, antifúngico e analgésico.

O espectro no infravermelho (figura 39) em pastilha de KBr apresentou banda de absorção larga em 3.379 a 3.088 cm<sup>-1</sup> referente a deformação axial de grupos hidroxilas e em 2.923 e 2.826 cm<sup>-1</sup> bandas de deformação axiais assimétrica e simétrica respectivamente de metileno (CH<sub>2</sub>). Em 1.655 cm<sup>-1</sup> uma banda intensa de deformação axial de C = O. Observou-se o espectro no IV várias bandas de absorções de intensidades médias, relativas às deformações axiais das ligações C – C do anel aromático em 1.611, 1.576, 1551 e 1.511 cm<sup>-1</sup>. Em 1.291 1.248, 1.192 e 1.105 cm<sup>-1</sup> bandas de deformações angulares no plano das ligações C-H do anel e em 847 cm<sup>-1</sup>

banda de intensidade média relacionada à deformação angular fora do plano das ligações C – H do anel<sup>117, 118</sup>.

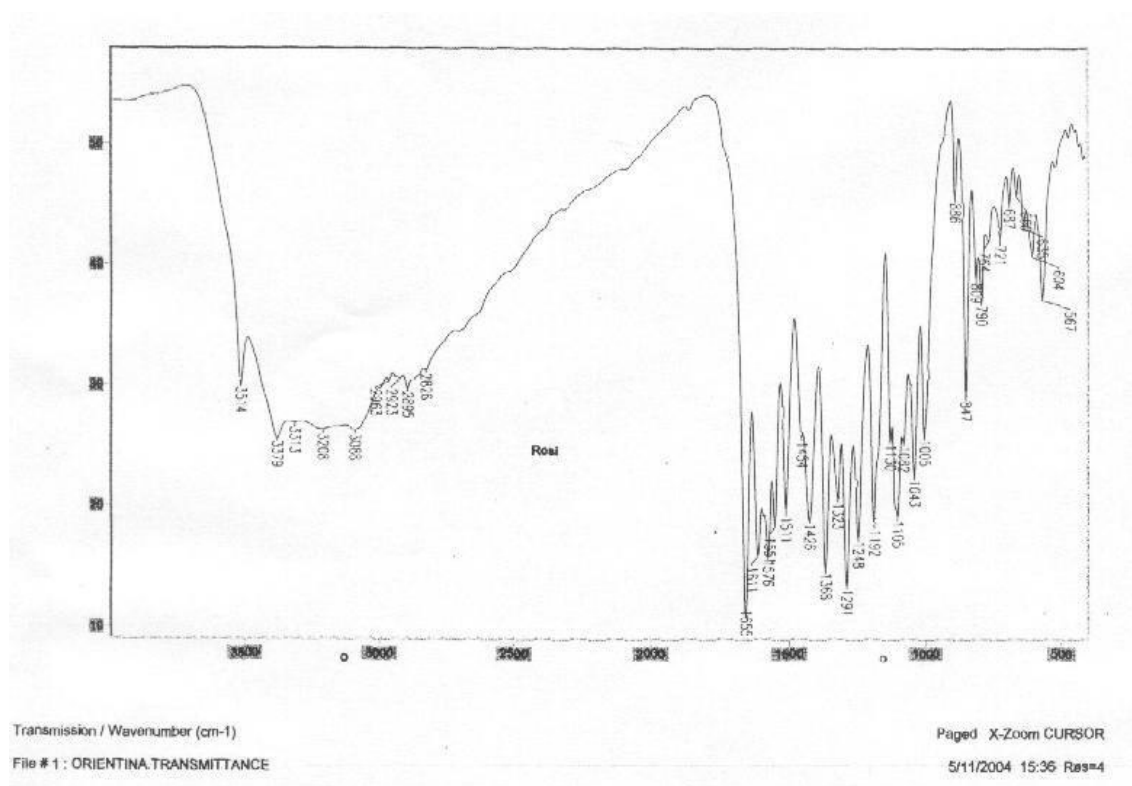


FIGURA 39 - Espectro no IV (KBr) do composto AE – 31/75

O espectro de RMN  $^1\text{H}$  (Figura 40) apresentou um simpleto em 13,17  $\delta$  correspondente a hidroxila ligada ao C-5. Na região de aromáticos foi observado dois simpletos, um em 6,65  $\delta$  que é característico do H-3 em flavonas e o outro em 6,26  $\delta$  ao H-6 do anel A. Foi atribuído a presença de 3 sinais na forma de dupletos em 7,53 ( $J = 7,39$  Hz), 7,48 e em 6,87  $\delta$  ( $J = 10,0$  Hz) aos prótons H-6', H-2' e H-5'. Os sinais entre 4,68 a 3,27  $\delta$  indicam a presença de uma unidade de açúcar na molécula ligada em C-8. Um duplete centrado em 4,68  $\delta$  ( $J = 10,0$  Hz) atribuído ao hidrogênio do carbono anomérico H-1''. O espectro registrou 5 multipletos: em 3,85  $\delta$  assinalado para H-2'', em 3,79  $\delta$  para H-5'', em 3,55  $\delta$  para H-4'', em 3,36  $\delta$  para os hidrogênios

metileno H-6'' e em 3,27  $\delta$  para o H-3''. Esses sinais apresentados para a porção glicosídica aliados aos dados da literatura, sugerem a estrutura é da glucose para a porção glicosídica<sup>118, 119</sup>.

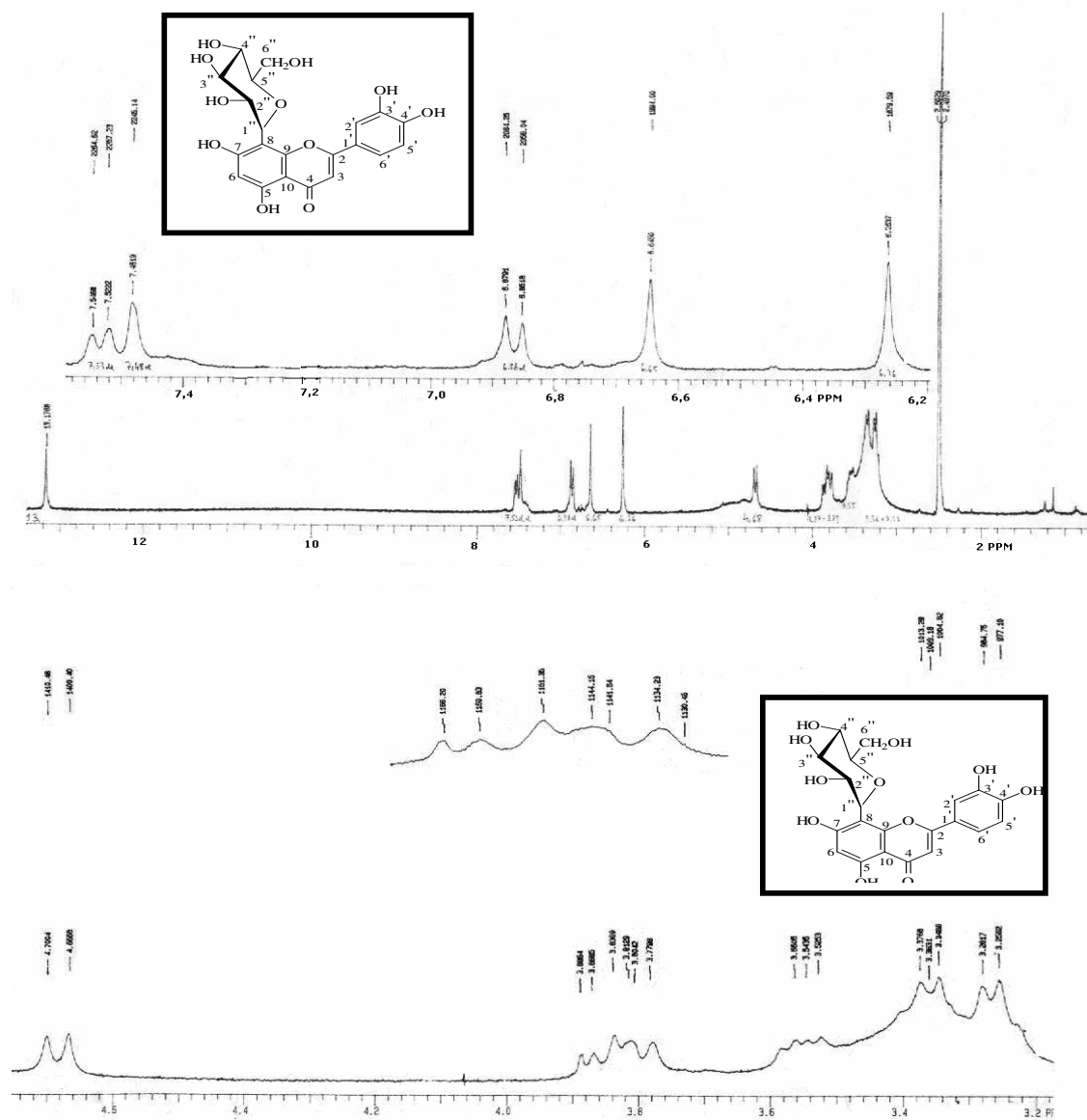


FIGURA 40 - Espectro de RMN  $^1\text{H}$  (300 MHz/  $\text{DMSO}-d_6$ ) do composto AE – 31/71

O espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  (Figura 41) apresentou sinais em 104,2  $\delta$  referente ao C-8 do anel aromático e 73,6  $\delta$  atribuído C - 1'', indicando uma C - substituição no



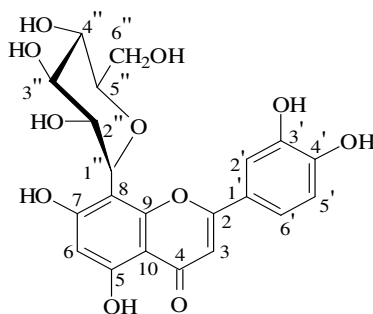


TABELA 22 – Dados de RMN<sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C do composto AE-31/75 da literatura<sup>118</sup>

COMPOSTO AE-31/75 (DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> )			ORIENTINA (DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> )	
POSICÃO	δ <sub>C</sub> PPM	δ <sub>H</sub> PPM	δ <sub>C</sub> PPM	δ <sub>H</sub> PPM <sup>118</sup>
C <sub>1</sub>	-	-	-	-
C <sub>2</sub> (C)	164,24	-	164,0	-
C <sub>3</sub> (CH)	102,57	6,64 (s)	102,3	6,64 (s)
C <sub>4</sub> (C)	182,18	-	181,9	-
C <sub>5</sub> (C)	160,56	13,17 (s)	160,3	13,6 (s)
C <sub>6</sub> (CH)	98,32	6,26 (s)	98,0	6,27 (s)
C <sub>7</sub> (C)	162,85	-	162,4	10,83 (s)
C <sub>8</sub> (C)	104,73	-	104,4	-
C <sub>9</sub> (C)	156,18	-	155,9	-
C <sub>10</sub> (C)	104,16	-	103,9	-
C <sub>1'</sub> (C)	122,14	-	121,9	-
C <sub>2'</sub> (CH)	114,23	7,48 (d)	114,0	7,48 (d, <i>J</i> = 1,8 Hz)
C <sub>3'</sub> (C)	145,88	-	145,7	9,07 (s)
C <sub>4'</sub> (C)	148,85	-	149,5	10,3 (s)
C <sub>5'</sub> (CH)	115,81	6,87 (d, <i>J</i> = 8,1 Hz)	115,6	6,87 (d, <i>J</i> = 7,9 Hz)
C <sub>6'</sub> (CH)	118,83	7,53 (d, <i>J</i> = 7,39 Hz)	119,3	7,53 (dd, <i>J</i> = 7,9-1,8 Hz)
C <sub>1''</sub> (CH)	73,57	4,68 (d, <i>J</i> = 10,0 Hz)	73,3	4,69 (d, <i>J</i> = 9,7 Hz)
C <sub>2''</sub> (CH)	70,94	3,85 (m)	70,7	3,9 – 3,8 (m)
C <sub>3''</sub> (CH)	78,84	3,27 (m)	78,7	3,5 – 3,2 (m)
C <sub>4''</sub> (CH)	70,87	3,55 (m)	70,6	3,5 – 3,2 (m)
C <sub>5''</sub> (CH)	82,18	3,79 (m)	81,9	3,5 – 3,2 (m)
C <sub>6''</sub> (CH <sub>2</sub> OH)	61,81	3,36 (m)	61,5	3,56 (m)

NOTAS: multiplicidade dos sinais: s = simplete, d = duplete, dd = duplo duplete, m = multiplete; solvente = DMSO-*d*<sub>6</sub>; TMS = padrão interno, *J* = constante de acoplamento em Hertz.

Os dados espectroscópicos obtidos para o composto AE – 31/75 indicam um padrão conhecido para 3',4',5,7 tetraidroxiflavona. Dessa forma foi possível atribuir a estrutura como sendo 8-β-C-glucopiranosil-3',4',5,7-tetraidroxi-flavona, conhecida por orientina (**56**) isolado pela primeira vez de uma espécie do gênero *Piper*.

Orientina (**56**)

### 5.5.3 Isolamento do Composto AE - 49/65

O composto AE-49/65 foi purificado pelo processo de filtração, empregando-se uma mistura dos solventes: acetona e metanol (1:1). Após a evaporação do solvente, obteve-se 43 mg de um sólido amorfo de coloração amarelo escuro, o qual foi analisado por CCD. O composto revelou reação positiva com cloreto férrico a 3 %, sugerindo ser um composto fenólico. A estrutura química do AE-49/65 foi identificada com base nos dados fornecidos pelos espectros no IV, RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  (Figuras 42, 43, 44 e 45) e comparados com os valores descritos na literatura (tabela 23).

O espectro no IV (figura 42) em pastilha de KBr apresentou uma banda larga de absorção em  $3.389\text{ cm}^{-1}$  relativa a deformação axial de OH e duas outras bandas em  $2.930$  e  $2.871\text{ cm}^{-1}$ . A primeira da deformação axial assimétrica e a segunda da deformação axial simétrica de metila. Em  $1642\text{ cm}^{-1}$ , uma banda intensa de deformação axial de  $\text{C} = \text{O}$  característico de carbonila conjugada, envolvida em ligação de hidrogênio intramolecular e em  $1067\text{ cm}^{-1}$  uma banda de absorção intensa referente à deformação axial assimétrica  $\text{C} - \text{O}$ . Observou-se um grupo de absorções na região de aromáticos <sup>122, 124, 125</sup>.

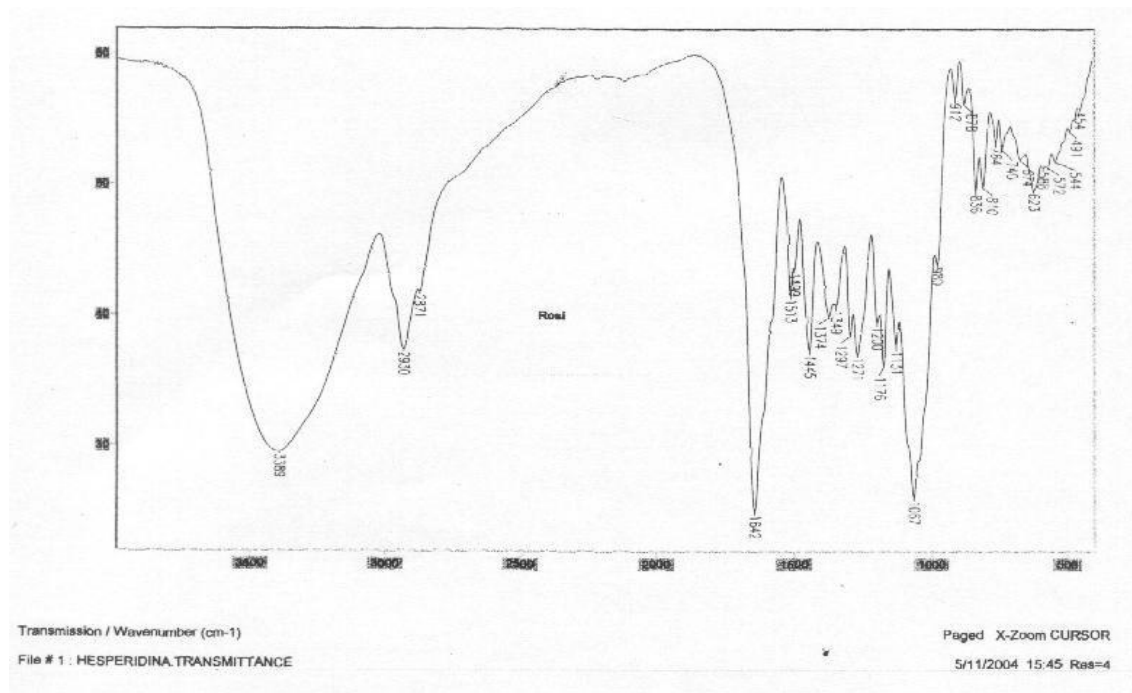


FIGURA 42 - Espectro no IV (KBr) do composto AE – 49/65

O espectro de RMN  $^1\text{H}$  ( Figuras 43 e 44) revelou sinal na forma de simpleto em 3,74  $\delta$  referente ao grupo metoxila. Observou-se os sinais em 5,64  $\delta$  (d,  $J = 7,38$  Hz) e em 5,49  $\delta$  (dd,  $J = 12,2$  e  $3,1$  Hz) atribuídos aos hidrogênios anoméricos H-1'' e H-1''', respectivamente. O deslocamento químico em 1,58  $\delta$  (d,  $J = 5,4$  Hz) sugerem que seja os hidrogênios do grupo metila da ramnose<sup>125</sup>. Observou-se no espectro um sinal na forma de multipeto em 4,75 – 4,05  $\delta$ , relativo aos acoplamentos dos hidrogênios das moléculas da glicose e ramnose. Os sinais na forma de dupletos em 6,62  $\delta$  ( $J = 2,0$  Hz) e 6,51  $\delta$  ( $J = 2,0$  Hz) nos sugerem que o anel A do flavonóide seja 5,7– dioxigenado. O duplete na região espectral de 7,53  $\delta$  ( $J = 1,95$  Hz), simpleto em 6,99  $\delta$  e o duplo duplete em 7,12  $\delta$  foram atribuídos aos hidrogênios aromáticos do anel B do flavonóide, sugerindo que o composto AE-49/65 apresente uma estrutura do tipo 3'-hidroxi-4'metoxi. Outros sinais foram observados na espectro e estão correlacionados aos 2 hidrogênios ligados aos grupos OH – 5 e OH – 3', na forma de simpletos com deslocamentos químicos de 8,78  $\delta$  e 7,58  $\delta$  respectivamente. O par de duplo duplete em 5,49  $\delta$  ( $J = 12,2$  e  $3,1$  Hz) e 2,83  $\delta$  ( $J = 17,0$  e  $3,0$  Hz) foram atribuídos aos hidrogênios H-2 e H-3 respectivamente, característicos de hidrogênios alifáticos das flavanonas<sup>123, 125</sup>. Os deslocamentos químicos estão descritos na tabela 23.

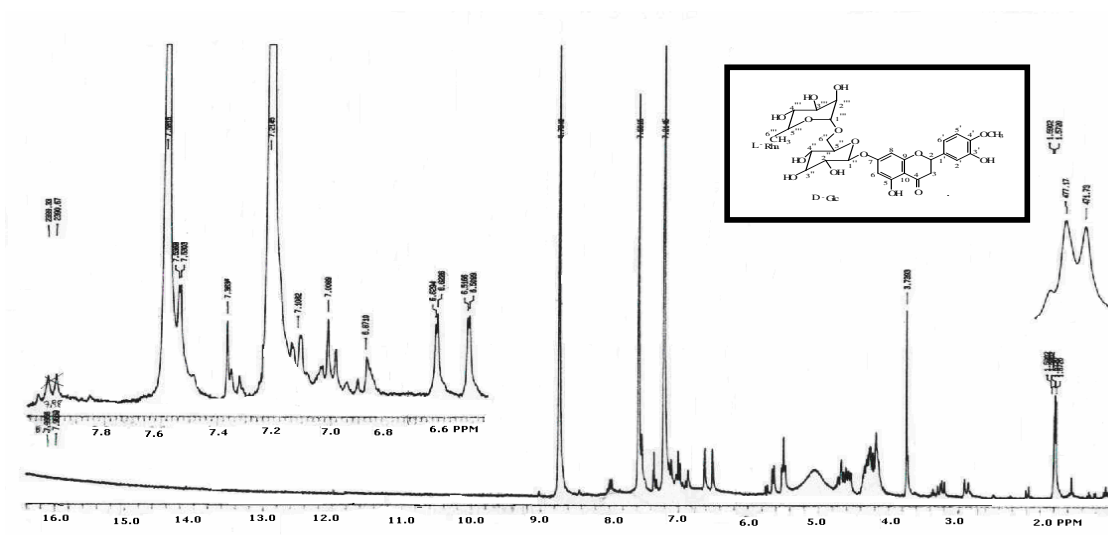


FIGURA 43 - Espectro de RMN  $^1\text{H}$  (300 MHz/  $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ ) do composto AE – 49/65



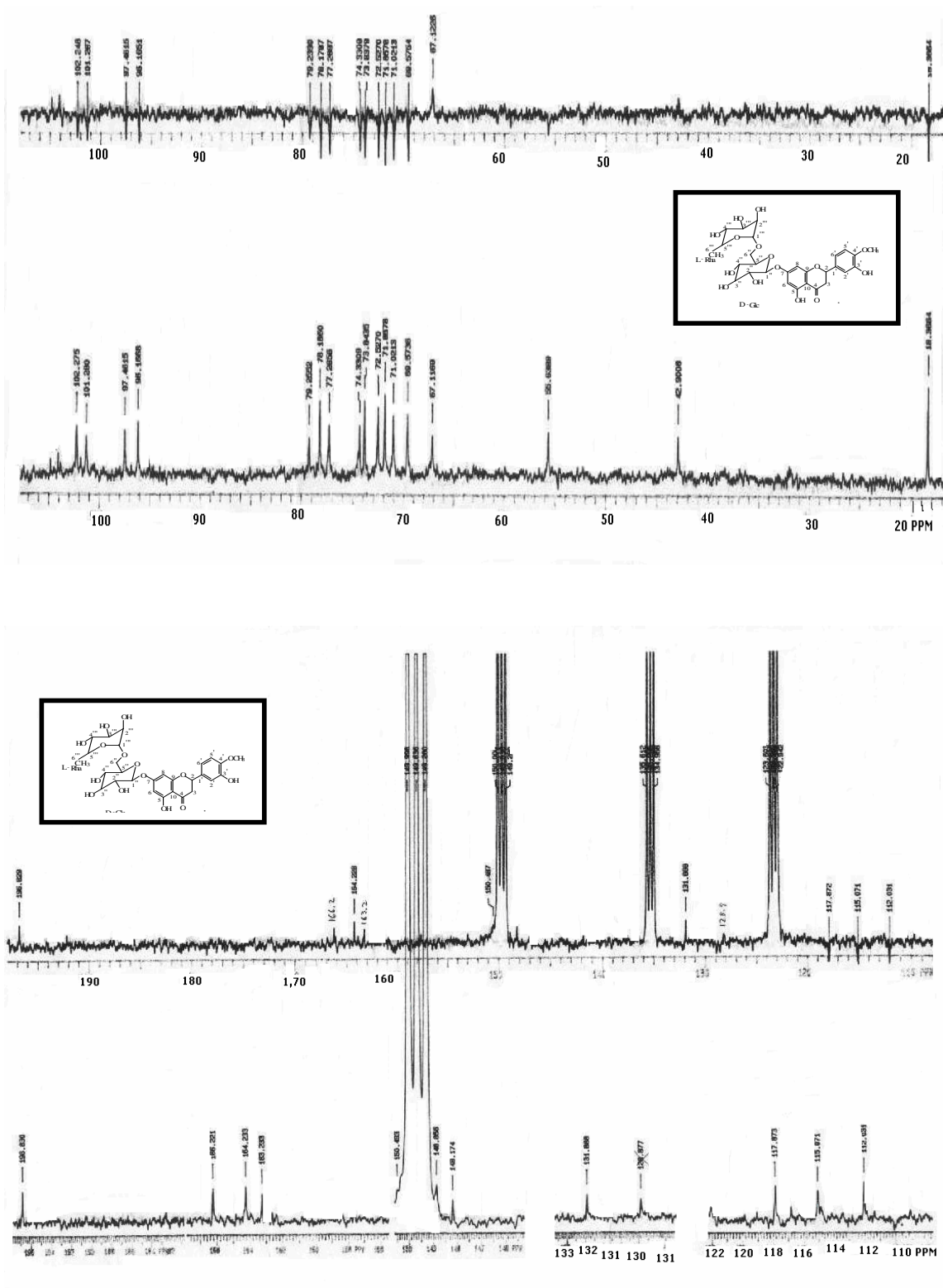


FIGURA 45 - Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  (75 MHz/ $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ ) do composto AE – 49/65

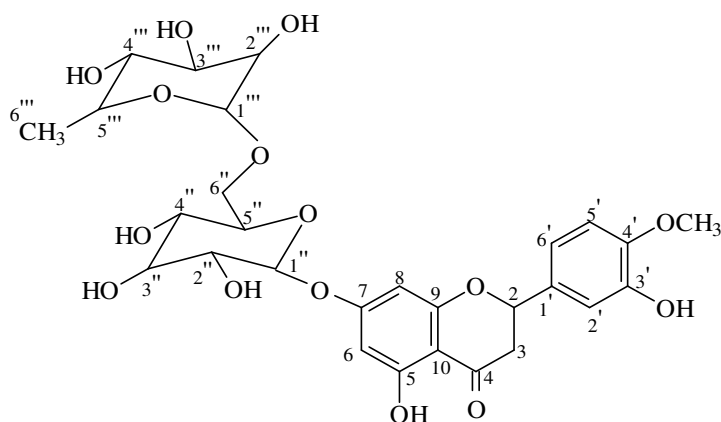
Os dados espectroscópicos obtidos por RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  nesta pesquisa e expostos na tabela 23 foram comparados com duas referências bibliográficas, pelo fato de que existem divergências para os valores atribuídos aos deslocamentos químicos de carbono entre os pesquisadores, salientando-se que os espectros da literatura foram feitos no solvente dimetilsulfóxido deuterado (DMSO- $d_6$ ).

TABELA 23 – Comparação dos dados de RMN  $^{13}\text{C}$  e  $^1\text{H}$  do composto AE-49/65 e literatura<sup>122, 125</sup>

<i>COMPOSTO AE- 49 / 65 (C<sub>5</sub>D<sub>5</sub>N)</i>			<i>HESPERIDINA<sup>122</sup></i> <i>(DMSO-d<sub>6</sub>)</i>		<i>HESPERIDINA</i> <i>(DMSO-d<sub>6</sub>)<sup>125</sup></i>	
<b>N<sup>o</sup> C</b>	<b>δ<sub>C</sub> PPM</b>	<b>δ<sub>H</sub> PPM</b>	<b>δ<sub>C</sub> PPM</b>	<b>δ<sub>H</sub> PPM</b>	<b>δ<sub>C</sub> PPM</b>	<b>δ<sub>H</sub> PPM</b>
C <sub>1</sub>	-	-	-	-	-	-
C <sub>2</sub>	79,25	5,49(dd, $J=3,1-12,2\text{Hz}$ )	79,28	5,50(dd, 3 -10Hz)	78,6	5,50(d- $J=9,0\text{Hz}$ )
C <sub>3</sub>	42,90	2,83(dd, $J=3,0-17,0\text{Hz}$ )	42,93	2,70-3,20 (m)	42,1	2,50-2,90 (m)
C <sub>4</sub>	196,83	-	197,1	-	197,1	-
C <sub>5</sub>	163,23	-	162,6	-	163,1	-
C <sub>6</sub>	97,46	6,62(d, $J=2,0\text{ Hz}$ )	96,4	6,10 (s)	96,3	6,50 (s)
C <sub>7</sub>	166,20	-	165,2	-	165,2	-
C <sub>8</sub>	96,16	6,51 (d, $J=2,0\text{Hz}$ )	95,7	6,10 (s)	95,5	6,91 (s)
C <sub>9</sub>	164,23	-	163,1	-	162,6	-
C <sub>10</sub>	104,10	-	103,7	-	103,1	-
C <sub>1'</sub>	131,88	-	130,0	-	131,0	-
C <sub>2'</sub>	115,07	7,53 (d, $J=1,95\text{Hz}$ )	110,5	6,95 (s)	114,2	6,75-6,95(m)
C <sub>3'</sub>	148,17	-	147,0	-	146,5	-
C <sub>4'</sub>	148,86	-	146,0	-	148,0	-
C <sub>5'</sub>	112,03	6,99 (s)	112,0	6,92 (s)	112,0	6,75-6,95(m)
C <sub>6'</sub>	117,87	7,12 (dd)	118,0	6,92 (s)	118,0	6,75-6,95(m)
OCH <sub>3</sub>	55,64	3, 74 (s)	55,8	3,82(s)	55,7	3,85 (s)
OH -5	-	8,78 (s)	-	12,3 (s)	-	12,00 (s)
OH-3'	-	7,58 (s)	-	-	-	9,10 (s)
1''	101,28	5,64 (d, $J=7,38\text{Hz}$ )	99,5	4,90 (d, $J=6,0\text{Hz}$ )	100,7	4,98(d, $J=8,0\text{Hz}$ )
2''	74,33	4,75 – 4,05 (m)	69,2	4,72 – 4,2 (m)	73,1	3,20-3,90(m)
3''	78,19	4,75 – 4,05 (m)	78,6	4,72 – 4,2 (m)	76,4	3,20-3,90(m)
4''	69,57	4,75 – 4,05 (m)	69,60	4,72 – 4,2 (m)	69,7	3,20-3,90(m)
5''	77,28	4,75 – 4,05 (m)	76,3	4,72 – 4,2 (m)	75,6	3,20-3,90(m)
6''	67,12	4,75 – 4,05 (m)	66,1	4,72 – 4,2 (m)	66,1	3,20-3,90(m)
1'''	102,27	5,49(dd, $J=3,1-12,2\text{Hz}$ )	100,0	4,60 (s)	99,5	4,50 (s)
2'''	71,02	4,75 – 4,05 (m)	70,4	4,72 – 4,2 (m)	70,4	3,20-3,90(m)
3'''	71,86	4,75 – 4,05 (m)	70,3	4,72 – 4,2 (m)	70,8	3,20-3,90(m)
4'''	72,53	4,75 – 4,05 (m)	69,6	4,72 – 4,2 (m)	72,2	3,20-3,90(m)
5'''	73,84	4,75 – 4,05 (m)	68,4	4,72 – 4,2 (m)	68,4	3,20-3,90(m)
6'''	18,37	1,58 (d, $J=5,4\text{ Hz}$ )	17,9	1,07(d, $J=6,0\text{Hz}$ )	17,9	1,10(d, $J=6,8\text{Hz}$ )

NOTAS: multiplicidade dos sinais: s = singlete, d = duplete, dd = dublete de dublete, m = multiplete; solvente = (C<sub>5</sub>D<sub>5</sub>N); TMS = padrão interno,  $J$  = constante de acoplamento em Hertz.

O composto isolado AE – 49/65 foi analisado por RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  e foi identificado, como sendo 7-O-rutinosil-3,5-diidroxi-4'-metoxiflavanona (**57**), o qual foi denominado de hesperidina, isolado pela primeira vez na espécie vegetal *Piper solmsianum* C.DC. *solmsianum*<sup>122, 123</sup>.



Hesperidina (**57**)<sup>123</sup>

#### 5.5.4 Identificação do Composto AE-72/101

A subfração AE-72/101 após sucessivas CC e purificação por filtração com uma mistura de acetato de etila e metanol (1:1), obteve-se 27,3 mg de um sólido amorfo de coloração castanha, o qual foi analisado por CCD e revelação com cloreto férrico a 3%. A cromatoplaça nos demonstrou que o composto AE-72/101 está puro e nos sugere que seja um flavonóide e demonstrou estar puro.

O espectro de RMN  $^1\text{H}$  (Figura 46) apresentou absorções na região de hidrogênios aromáticos, em 7,40  $\delta$ ; 6,91  $\delta$  (d,  $J = 10,4$  Hz) e 6,73  $\delta$  atribuídos aos hidrogênios H-2', H-5' e H-6' do anel B, respectivamente. Outros 2 dupletos em 6,58 e 6,51  $\delta$  são referentes aos hidrogênios H-6 e H-8 do anel A. Observa-se um simpleto em 3,74  $\delta$  referente ao grupamento metoxila. Um multiplete na região de 3,91 a 3,34  $\delta$ , foi atribuído aos hidrogênios das moléculas da glicose e ramnose. O hidrogênio



anomérico da glicose H-1'' é observado em 5,02  $\delta$  e em 4,72  $\delta$  observa-se o hidrogênio anomérico da ramnose H-1'''. O deslocamento químico na forma de duplete em 1,18  $\delta$  ( $J = 6,0$  Hz) sugere os hidrogênios do grupo metila ligada a ramnose<sup>125</sup>. Os dupletos em 6,58 e  $\delta$  6,51  $\delta$  nos sugerem que o anel A do flavonóide seja 5,7-dioxigenado<sup>126,128</sup>. Os deslocamentos químicos estão descritos na tabela 24.

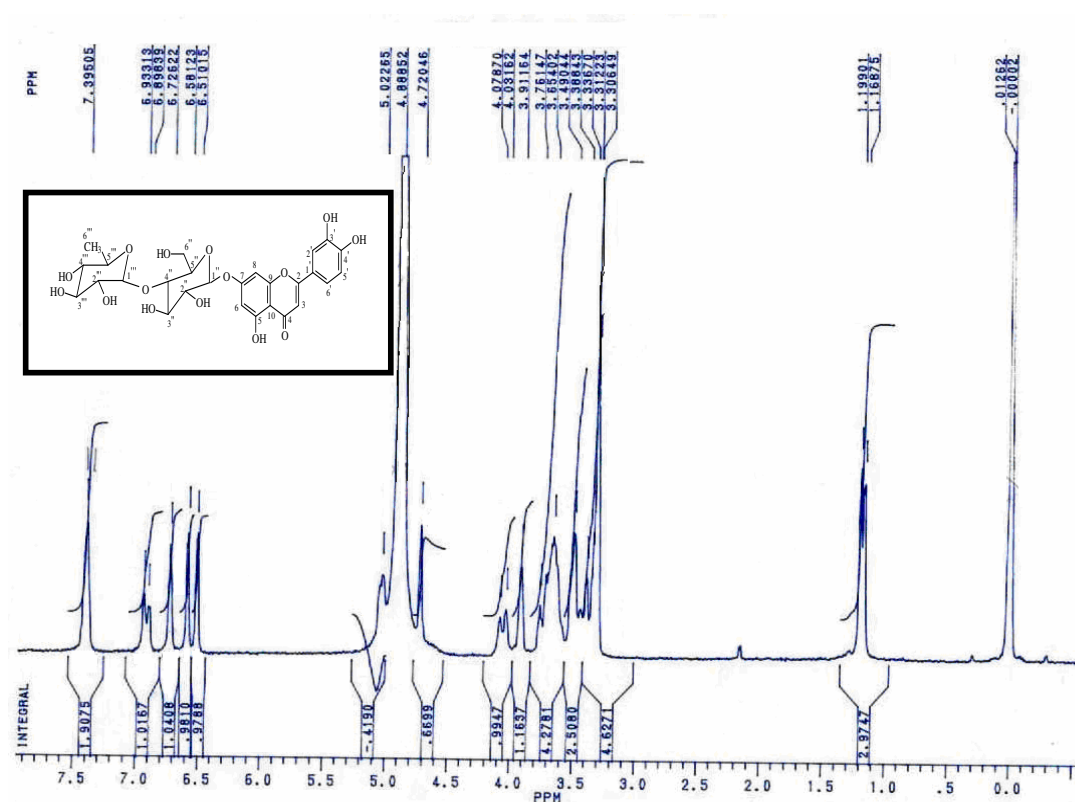


FIGURA 46 - Espectro de RMN  $^1\text{H}$  (200 MHz/MeOH- $d_4$ ) do composto AE – 92/101

Os espectros de RMN  $^{13}\text{C}/\text{DEPT}$  (Figuras 47 e 48) apresentaram deslocamentos químicos que nos indicam que o composto AE-72/101 apresenta 2 unidades monossacarídica na sua estrutura química, em virtude da ligação ( $1''' \rightarrow 6''$ ) e  $\text{CH}_2 - 6''$  da glicose ser registrado em campo mais baixo do espectro, em 69,84  $\delta$  e o deslocamento químico em 17,94  $\delta$  atribuído ao grupamento metila da ramnose. A ligação da unidade glicopiranosose pelo átomo de oxigênio ligado ao carbono C-7 da aglicona baseou-se no 164,76  $\delta$ <sup>126</sup>. Os deslocamentos químicos em 166,97 e 104,28  $\delta$

foram atribuídos aos C-2 e C-3 respectivamente<sup>128,129</sup>. Os deslocamentos químicos dos carbonos quaternários C-1' (130,65  $\delta$ ), C-3' (147,04  $\delta$ ) e C - 4' (151,24  $\delta$ ) e metínicos CH-2' (114,34  $\delta$ ), CH-5' (116,92  $\delta$ ) e CH-6' (123,53  $\delta$ ) concordam com a estrutura química das flavonas glicosídicas<sup>127</sup>. O sinal de metoxila foi detectado em 55,64  $\delta$ . O espectro de RMN <sup>13</sup>C/ DEPT foi usado para reconhecer os sinais correspondentes a átomos de carbono quaternários, metínicos (C-H), metilênicos (CH<sub>2</sub>) e metílicos (CH<sub>3</sub>). Os dados dos deslocamentos químicos estão descritos na tabela 24.

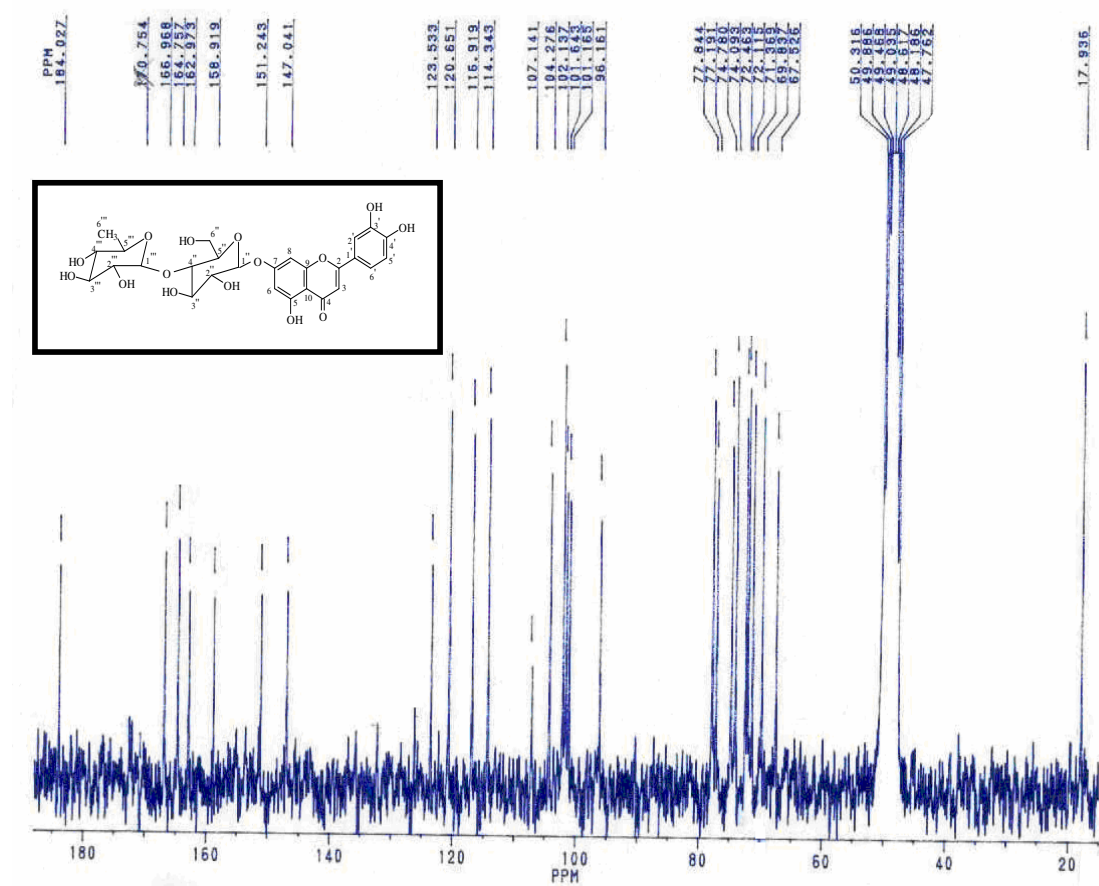


FIGURA 47 - Espectro de RMN <sup>13</sup>C (50 MHz/MeOH-*d*<sub>4</sub>) do composto AE – 92/101

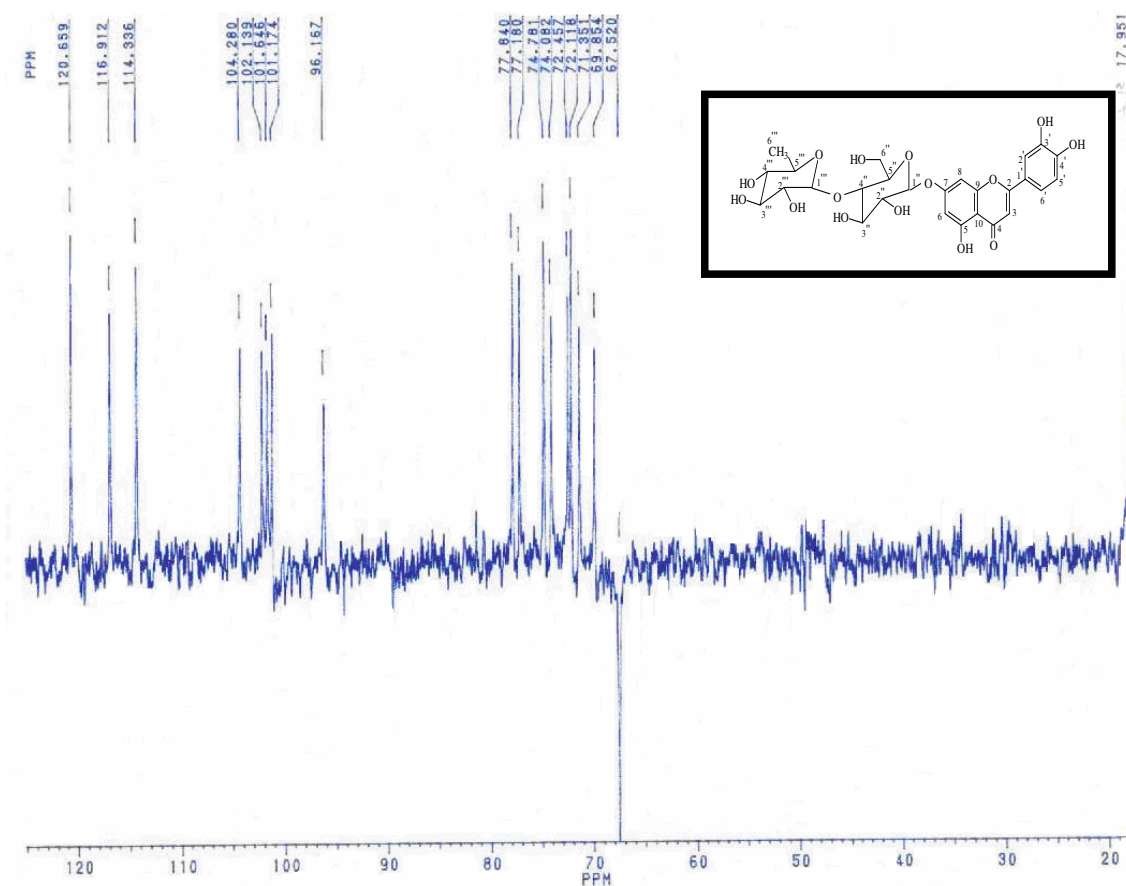
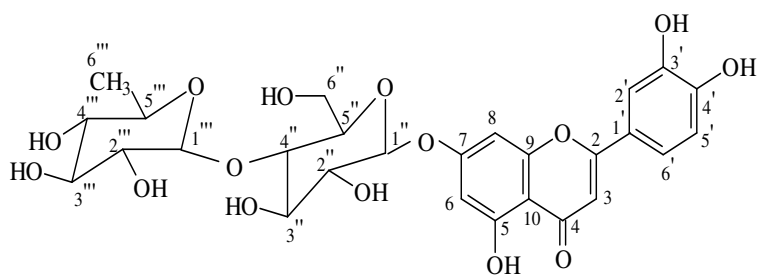


FIGURA 48 - Espectro de DEPT (50 MHz/MeOH- $d_4$ ) do composto AE – 92/101



Luteolina-7-rutenosídeo (**58**)<sup>126</sup>

TABELA 24 – Comparação dos dados de RMN<sup>13</sup>C e <sup>1</sup>H do composto AE-72/101 com a literatura<sup>126</sup>

COMPOSTO AE-92/101 (MeOH-d <sub>4</sub> )			LUTEOLINA-7-O-GLICOSE/RAMNOSE <sup>126</sup> (DMSO-d <sub>6</sub> )	
POSICÃO	δ <sub>C</sub> PPM	δ <sub>H</sub> PPM	δ <sub>C</sub> PPM <sup>126</sup>	δ <sub>H</sub> PPM <sup>126</sup>
C <sub>1</sub> (O)	-	-	-	-
C <sub>2</sub> (C)	166,97	-	167,37	-
C <sub>3</sub> (CH)	104,28	6,72 (s)	102,90	6,61(s)
C <sub>4</sub> (C)	184,03	-	181,66	-
C <sub>5</sub> (C)	162,97	-	161,58	-
C <sub>6</sub> (CH)	101,64	6,58 (d)	99,43	6,04 (d, J = 1,3 Hz)
C <sub>7</sub> (C)	164,76	-	163,69	-
C <sub>8</sub> (CH)	96,16	6,51 (d)	95,00	6,38 (d, J = 1,3 Hz)
C <sub>9</sub> (C)	158,92	-	157,88	-
C <sub>10</sub> (C)	104,27	-	103,01	-
C <sub>1'</sub> (C)	120,65	-	120,90	-
C <sub>2'</sub> (CH)	114,34	7,40 (d)	114,85	6,38 (d, J = 2,0 Hz)
C <sub>3'</sub> (C)	147,04	-	146,01	-
C <sub>4'</sub> (C)	151,24	-	153,02	-
C <sub>5'</sub> (CH)	116,92	6,91 (d, J = 10,4 Hz)	117,25	6,89 (dd, J = 8,5-2,0 Hz)
C <sub>6'</sub> (CH)	123,53	7,41 (d)	122,08	7,47 (d, J = 8,5 Hz)
OH	-	-	-	-
1''(CH)	102,14	5,02 (d)	100,85	-
2''(CH)	74,78	3,91 – 3,34 (m)	72,47	-
3''(CH)	77,19	3,91 – 3,34 (m)	77,51	-
4''(CH)	69,84	3,91 – 3,34 (m)	70,85	-
5''(CH)	77,84	3,91 – 3,34 (m)	77,63	-
6'' (CH <sub>2</sub> )	69,84	3,91 – 3,34 (m)	68,92	-
1'''(CH)	101,16	4,72 (d)	99,27	-
2'''(CH)	72,11	3,91 – 3,34 (m)	70,79	-
3'''(CH)	71,37	3,91 – 3,34 (m)	70,22	-
4'''(CH)	72,46	3,91 – 3,34 (m)	72,47	-
5'''(CH)	67,53	4,05 (d, J = 9,4 Hz)	68,92	-
6'''(CH <sub>3</sub> )	17,94	1,18 (d, J = 6,0 Hz)	18,23	-

NOTAS: multiplicidade dos sinais: s = simpleto, d = duplete, dd = duplo duplete e m = multiplete; J = constante de acoplamento em Hz, TMS = padrão interno, Solvente = MeOH-d<sub>4</sub>

A flavona AE – 72/101 foi identificada como sendo luteolina-7-rutenosídeo (**58**) através da análise dos dados obtidos de RMN <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C/DEPT e por comparação com os dados descritos na literatura<sup>126, 127</sup>. Este flavonóide foi isolado pela primeira vez na espécie vegetal *Piper solmsianum* C.DC.var. *solmsianum*.

Os radicais livres têm sido relatados como a causa de doenças como o câncer, doenças do coração e inflamações. A geração de radicais livres pode ser inibida por mecanismos enzimáticos e não enzimáticos. Antioxidantes como os compostos

fenólicos são uma importante fonte nos mecanismos não enzimáticos e têm sido relatados por ter atividades biológicas, tais como: anticâncerígeno, antiinflamatória e na prevenção de doenças das coronárias do coração. Por estas razões, a utilização de antioxidantes é uma importante estratégia para prevenir a progressão das doenças causadas por radicais livres e preservar a qualidade dos alimentos por prevenir a peroxidação lipídica. As pesquisas desenvolvidas para avaliar o potencial antioxidante dos flavonóides, têm demonstrado que a orientina apresenta uma potente atividade como antioxidante <sup>119</sup>.

Os flavonóides têm sido reconhecidos como responsáveis por atividade antialérgica, antiinflamatória, antiviral, antiproliferativa e anticancerígena, além de afetar alguns aspectos do metabolismo de mamíferos. A hesperidina durante muito tempo foi denominada de vitamina P. Algumas indústrias farmacêuticas utilizam flavonóides puros, inclusive hesperidina, isolados de citrus (citroflavonóides)<sup>123</sup>.

O flavonóide hesperidina é uma flavanona glucosídica que compreende a classe da flavanona hesperitina e o dissacarídeo rutinose. A hesperidina é o flavonóide predominate em limões e laranjas. A parte da pele e membrana destes frutos têm alta concentração de hesperidina. Entretanto, suco de laranja contendo polpa é mais rico no flavonóide do que sem a polpa. Laranjas doces (*Citrus sinensis*) e tangerinas são as fontes dietéticas riquíssimas de hesperidina. A hesperidina é classificada como um citrus bioflavonóide. A hesperidina, em combinação com a flavona glicosilada chamada Diosmina, é usada na Europa para o tratamento de insuficiência venosa e hemorróidas. Hesperidina, rutina e outros flavonóides são empregados para reduzir a permeabilidade capilar e têm ação antiinflamatória sendo conhecida como vitamina P. Estas substâncias entretanto não são vitaminas<sup>130,131,132,133</sup>.

## 5.6 MODIFICAÇÕES ESTRUTURAIS NO CONOCARPANO

Sabe-se que a substituição de um átomo de H por um determinado substituinte (grupo alquila, grupo nitro, grupo ciano, grupo carboxilato, halogênio, etc.) pode modificar profundamente a potência, duração e ainda a natureza do efeito

farmacológico de uma molécula. Os estudos de correlação estrutura-atividade, fundamentados no efeito do substituinte em um determinado anel aromático, são muito comuns na química medicinal, uma vez que mais de 50 % dos fármacos ou compostos bioativos possuem este tipo de anel<sup>109</sup>.

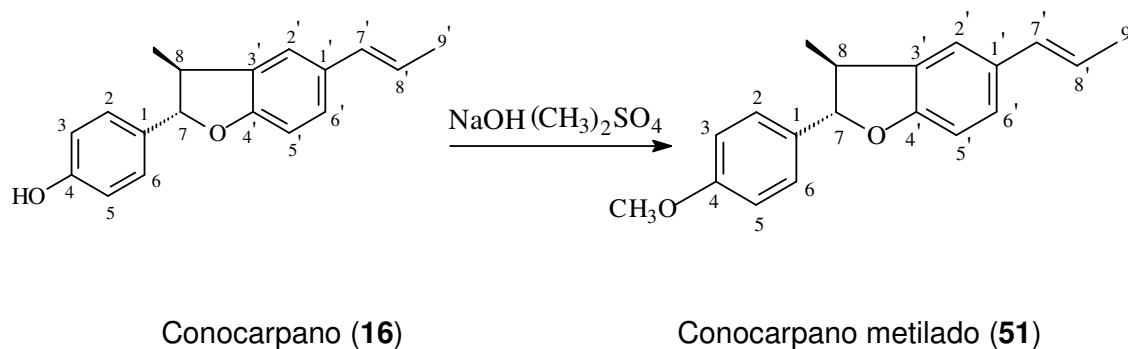
A maioria dos produtos naturais apresenta grupos hidroxilas, duplas ligações, grupos carbonilas e outros que são susceptíveis de serem modificados por reações químicas. Assim, por exemplo, um grupo hidroxila pode ser transformado em metoxi, acetoxi, benziloxi, etc; uma dupla ligação pode ser epoxidada ou hidrogenada, ou ainda sofrer uma reação de adição de diferentes grupos<sup>109</sup>.

O conocarpano tem demonstrado uma potente atividade antibacteriana e antifúngica. As modificações estruturais são estratégias químicas que se utiliza na tentativa de obtermos derivados com maior atividade biológica por se promover o aumento do caráter lipofílico da molécula, ou então contribuir para a formação de novos compostos na literatura.

As modificações estruturais no conocarpano não tiveram como objetivo principal o rendimento, mas sim a obtenção de quantidades suficientes dos produtos modificados para a realização dos testes farmacológicos.

#### 5.6.1 Reação de Metilação

O conocarpano em meio alcalino, forma o íon fenolato, o qual atua como reagente nucleófilo, atacando o sulfato de dimetila e deslocando o íon sulfato. Esta é a conhecida síntese de Williamson<sup>134</sup>. Deste processo, resultou na formação de uma mistura que foi purificada por coluna cromatográfica. O processo de purificação foi acompanhado por CCD. Obteve-se 0,042 g (0,151 mMol) do produto da reação, o qual foi denominado de ME-CON., com um rendimento de 57 %, solúvel em diclorometano e clorofórmio. O ME-CON. foi caracterizado por IV, RMN <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C<sup>135</sup> (Figuras 49, 50 e 51).



Observou-se na análise espectroscópica no IV (Figura 49) em pastilha de KBr o desaparecimento da banda referente à deformação axial de O - H do fenol na região do espectro de  $3.650$  a  $3.584\text{ cm}^{-1}$ , demonstrando a substituição do H da função OH pelo radical metila. Aparecimento de duas bandas de absorções em  $1.257\text{ cm}^{-1}$  e  $1.033\text{ cm}^{-1}$  relativo ao grupamento metoxila. Bandas de absorções de fraca intensidade em  $2.959$  e  $2.928\text{ cm}^{-1}$  resultante da deformação axial assimétrica de C - H e em  $2.882\text{ cm}^{-1}$  banda de deformação axial simétrica de C - H do grupamento metila. Em  $1.729\text{ cm}^{-1}$  absorção de pequena intensidade resultante da deformação angular simétrica de C - H e em  $1.453\text{ cm}^{-1}$  vibrações de deformações angulares assimétricas de C - H dos grupamentos metilas. Observou-se em  $1.610\text{ cm}^{-1}$  banda referente à deformação axial das ligações C = C do anel aromático, em  $1.257\text{ cm}^{-1}$  absorção relativa à deformação axial assimétrica O - C - C e em  $1.033\text{ cm}^{-1}$  banda referente à deformação axial C - O - C de compostos com heteroaromáticos. Em  $961\text{ cm}^{-1}$  banda referente à deformação angular fora do plano de C - H de alcenos e em  $823\text{ cm}^{-1}$  de aromáticos.

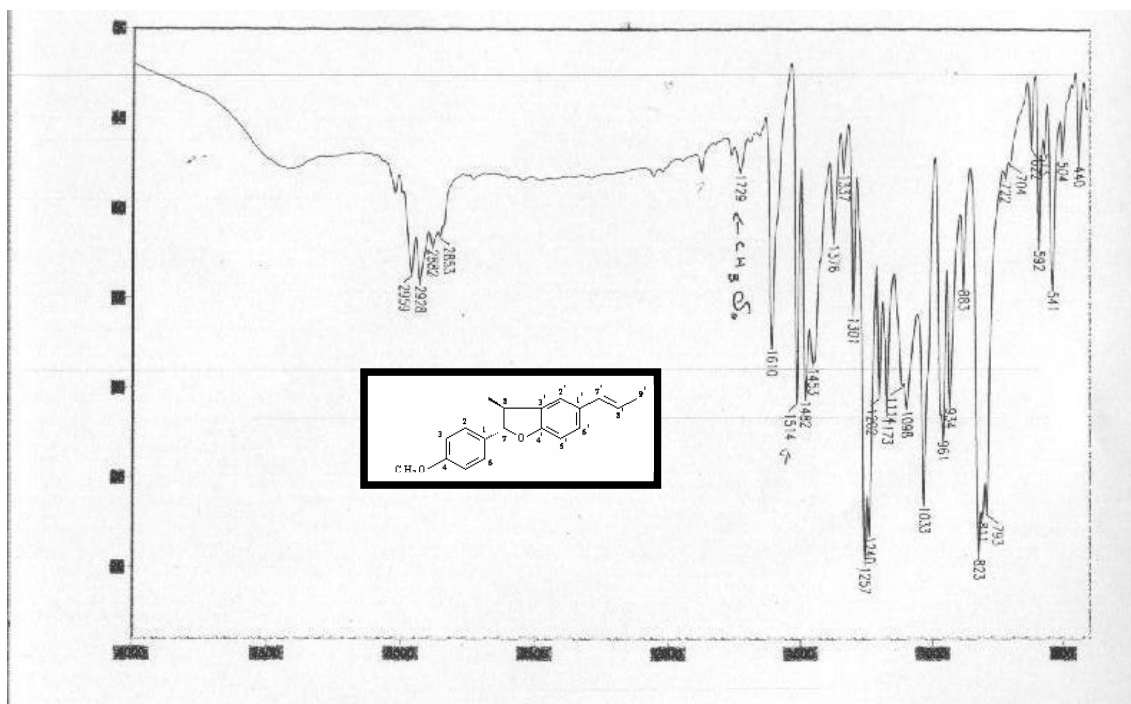
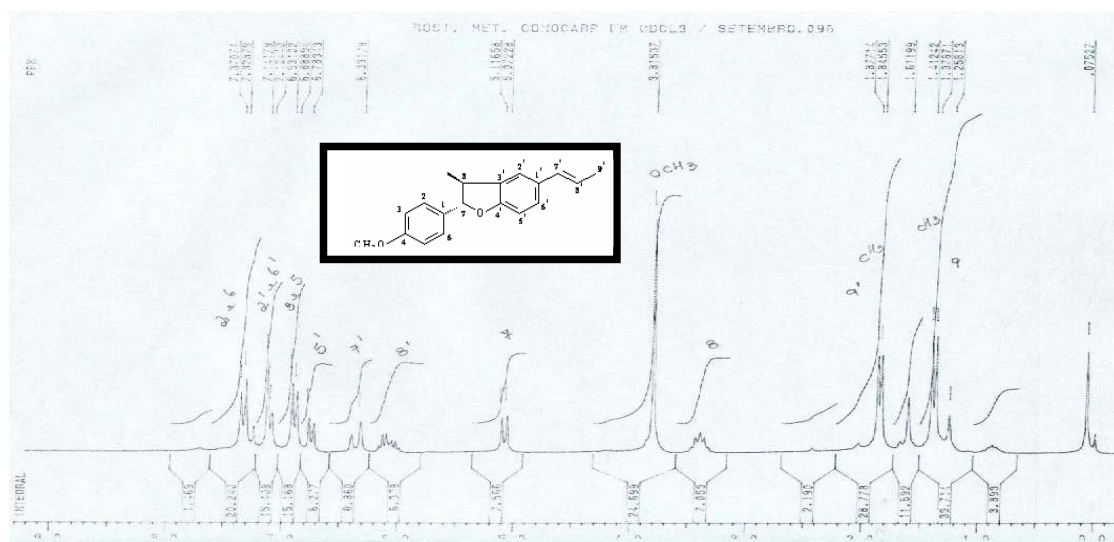


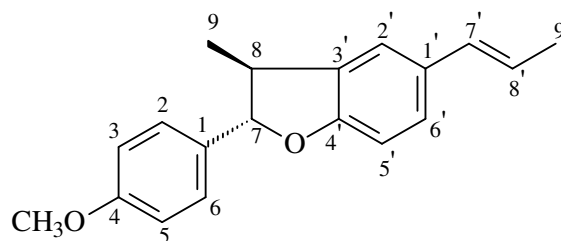
FIGURA 49 - Espectro no IV do composto Me-CON

Pelo espectro de RMN  $^1\text{H}$  (Figura 50) observou-se o desaparecimento do sinal referente à absorção do hidrogênio da hidroxila fenólica e o surgimento do sinal em forma de simpleto em 3,81  $\delta$  dos hidrogênios atribuídos ao grupamento metoxila. A tabela 25 mostra os valores dos deslocamentos químicos de RMN  $^{13}\text{C}$  e  $^1\text{H}$  obtidos para ME-CON e os dados da literatura para o conocarpano.

A principal mudança observada no espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  (Figura 50) foi o surgimento do deslocamento químico em 55,30  $\delta$  referente à metoxila, indicando a formação do derivado metilado do conocarpano.





Conocarpano metilado (**51**)TABELA 25 – Valores dos deslocamentos químicos ( $\delta$ ) de RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  para DCM-22, Me-CON e dados da literatura para o conocarpano metilado<sup>69</sup>.

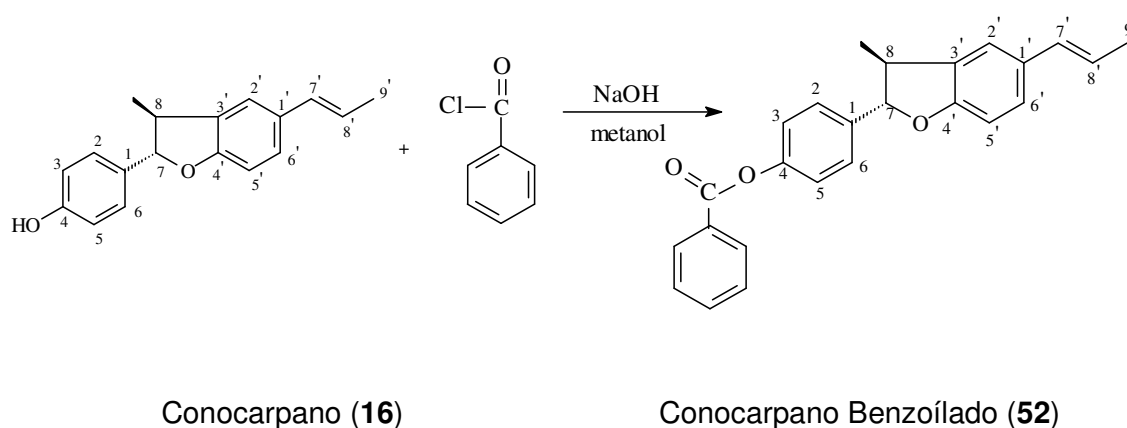
<i>CONOCARPANO (CDCl<sub>3</sub>)</i>			<i>ME - CON (CDCl<sub>3</sub>)</i>		CONOCARPANO METILADO <sup>69</sup> (CDCl <sub>3</sub> )	
Nº C	$\delta_{\text{C}}$ PM	$\delta_{\text{H}}$ PPM	$\delta_{\text{C}}$ PPM	$\delta_{\text{H}}$ PPM	$\delta_{\text{C}}$ PM	$\delta_{\text{H}}$ PPM
C <sub>1</sub>	131,3	-	131,2	-	130,8	-
C <sub>2</sub>	127,9	7,28(d, $J = 8,5$ Hz)	127,6	7,36(d, $J = 8,6$ Hz)	127,6	7,22-7,11 (m)
C <sub>3</sub>	115,4	6,80(d, $J = 8,6$ Hz)	114,0	6,92(d, $J = 8,6$ Hz)	113,6	6,91-6,86 (m)
C <sub>4</sub>	155,6	-	158,3	-	159,1	-
C <sub>5</sub>	115,4	6,80 (d, $J = 8,6$ Hz)	114,0	6,92(d, $J = 8,6$ Hz)	113,6	6,91-6,86 (m)
C <sub>6</sub>	127,8	7,28 (d -8,5 Hz)	127,6	7,36(d, $J = 8,6$ Hz)	127,6	7,22-7,11 (m)
C <sub>7</sub>	92,6	5,07 (d, $J = 8,9$ Hz)	92,6	5,10(d, $J = 8,8$ Hz)	87,9	5,75 (d, $J = 8,7$ Hz)
C <sub>8</sub>	45,1	3,38 (m)	45,2	3,42 (m)	40,8	3,62 (m)
C <sub>9</sub>	17,8	1,38 (d, $J = 6,8$ Hz)	17,8	1,40(d, $J = 6,80$ Hz)	16,8	0,82 (d, $J = 7,2$ Hz)
C <sub>1'</sub>	132,3	-	132,4	-	131,3	-
C <sub>2'</sub>	120,7	7,13 (s)	120,7	7,13(d, $J = 7,42$ Hz)	121,5	7,22-7,11 (m)
C <sub>3'</sub>	132,7	-	132,6	-	133,1	-
C <sub>4'</sub>	158,1	-	158,3	-	158,3	-
C <sub>5'</sub>	109,2	6,76 (d, $J = 8,4$ Hz)	109,2	6,78(d, $J = 8,6$ Hz)	109,2	6,80 (d, $J = 8,2$ Hz)
C <sub>6'</sub>	126,3	7,10 (d, $J = 1,68$ Hz)	126,2	7,13(d, $J = 7,42$ Hz)	126,2	7,22-7,11 (m)
C <sub>7'</sub>	130,7	6,36(dd, $J = 1,6-5,7$ Hz)	130,7	6,38(d, $J = 15,8$ Hz)	130,1	6,36(dd, $J = 15,7-1,5$ Hz)
C <sub>8'</sub>	123,1	6,09(dd, $J = 6,6-15,7$ Hz)	122,9	6,09 (m)	122,9	6,07 (m)
C <sub>9'</sub>	18,4	1,84(dd, $J = 1,6-6,6$ Hz)	18,4	1,87(d, $J = 6,3$ Hz)	18,4	1,86 (dd, $J = 6,6-1,6$ Hz)
OCH <sub>3</sub>	-	-	55,3	3,82 (s)	55,3	3,80 (s)

NOTAS: multiplicidade dos sinais: s = simples, d = duplo, dd = duplo duplo e m = multiplo;  $J$  = constante de acoplamento em Hz, TMS = padrão interno, Solvente = CDCl<sub>3</sub>.

### 5.6.2 Reação de Benzoilação

A benzoilação do conocarpano ocorreu em presença do reativo cloreto de benzoíla em meio alcalino. A reação de deslocamento direto, substituição nucleofílica em carbono ascila, a qual ocorreu sob agitação mecânica constante.

Primeiramente o hidróxido de sódio promove a desprotonação do fenol, formando o nucleófilo íon fenolato, o qual reagiu com o cloreto de benzoíla, resultando na formação do composto desejado e cloreto de sódio. O produto da reação foi purificado por cromatografia em coluna, usando-se como eluente hexano e acetato de etila com gradiente de polaridade crescente e monitorado por CCD. Desta reação obteve-se 0,033 g (0,089 mMol) de um sólido amarelo, o qual foi denominado de BEN-CON com um rendimento de 33,43%, solúvel em diclorometano e clorofórmio, o qual foi caracterizado por IV, RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}^{135}$  (Figuras 52, 53 e 54).



O espectro no infravermelho (Figura 52) do composto BEN-CON apresentou o desaparecimento da absorção na região de  $3.650$  a  $3.584\text{ cm}^{-1}$  referente a deformação axial O-H de fenóis e o aparecimento de uma banda de absorção intensa e aguda em  $1.734\text{ cm}^{-1}$  correspondente ao estiramento deformação axial de C = O. A presença das bandas de absorções em  $2.959$  e  $2.922\text{ cm}^{-1}$  foram atribuídas a deformação axial assimétrica de C-H e em  $2.873\text{ cm}^{-1}$  e deformação axial simétrica de C-H da metila. Na região do espectro de  $1.607\text{ cm}^{-1}$  e  $1.594\text{ cm}^{-1}$  bandas de deformação axial de C = C de aromáticos. Em  $1.449\text{ cm}^{-1}$  deformação angular assimétrica e em  $1.377\text{ cm}^{-1}$  deformação angular simétrica do grupamento metila. Em  $1.020\text{ cm}^{-1}$  banda referente à deformação axial C-O-C de compostos heteroaromáticos. Em  $1.196\text{ cm}^{-1}$  banda de deformação axial de C – C (= O) – O de acetato, Em  $972\text{ cm}^{-1}$  banda de deformação angular fora do plano de C-H de alkenos e em  $823\text{ cm}^{-1}$  de aromáticos.

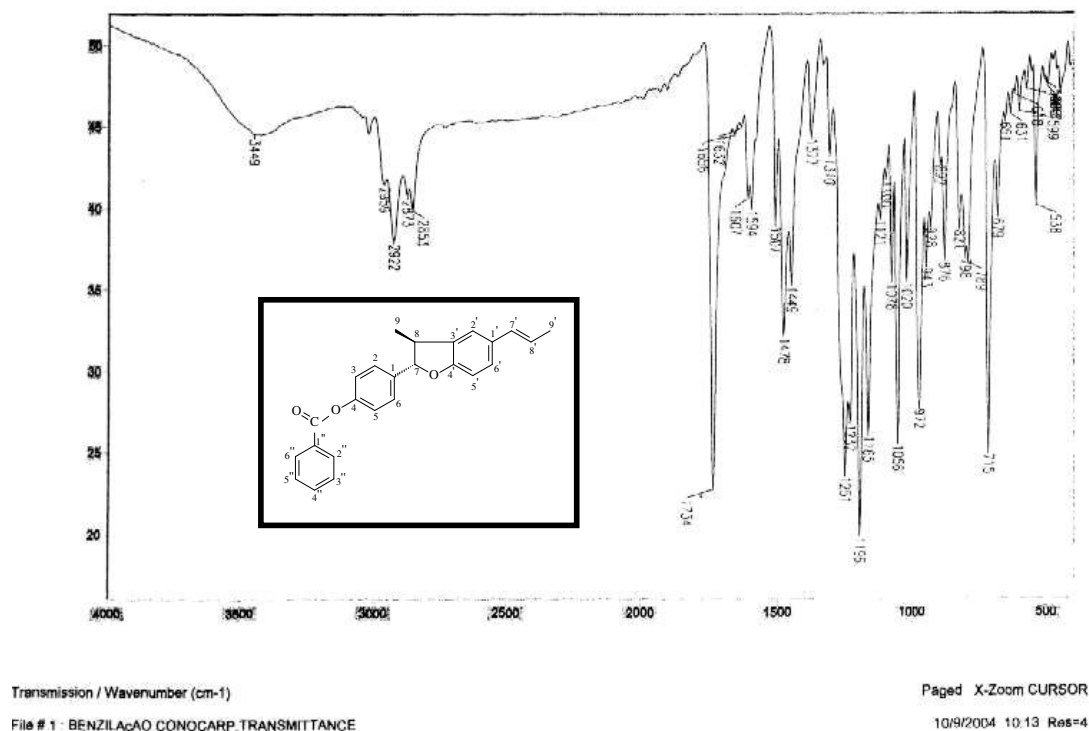


FIGURA 52 - Espectro no IV do composto BEN-CON

A espectroscopia de RMN <sup>1</sup>H (Figura 53) nos permitiu detectar o desaparecimento do sinal do hidrogênio de OH e o surgimento de um multipeto em 7,59 δ atribuídos aos hidrogênios aromáticos ligados a carbonila do acetato (C = O – O). Este sinal nos sugeriu que a reação química ocorreu, formando o composto desejado.

O espectro de RMN <sup>13</sup>C (Figura 54) difere do espectro do conocarpano pela presença do sinal em 165,10 δ referente à carbonila e a presença de mais 6 sinais de carbonos aromáticos em 138,43; 130,67; 128,56 e 129,42 δ atribuídos aos C-1'', C-

2''/C-4'', C -3''/C-5'' e C-6''. Os demais deslocamentos químicos encontram-se descritos na tabela 26 abaixo.

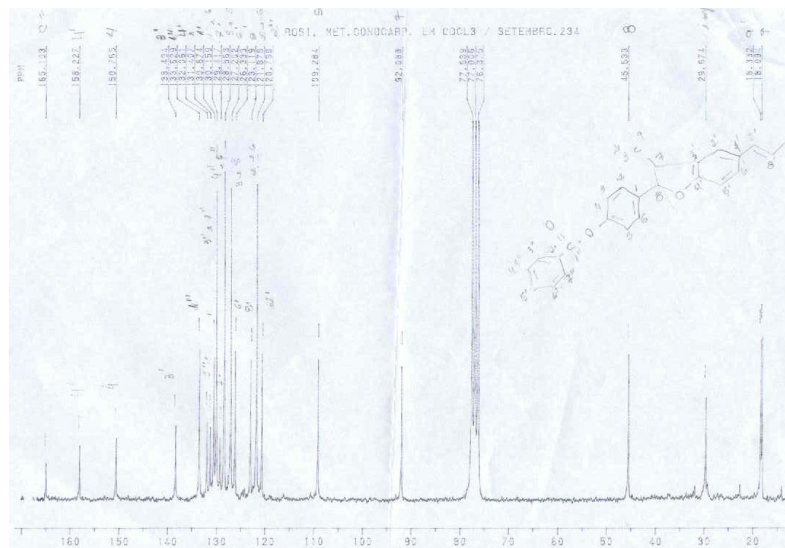


FIGURA 53 - Espectro de RMN  $^1\text{H}$  (300 MHz/  $\text{CDCl}_3$ ) do composto BEN-CON

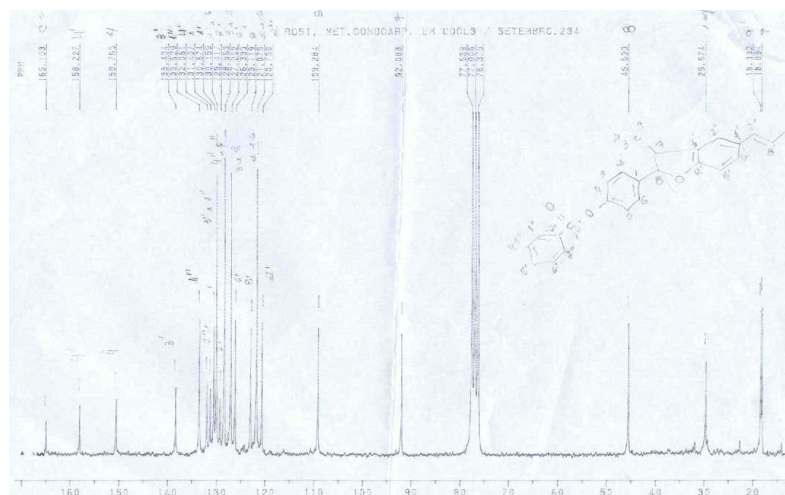
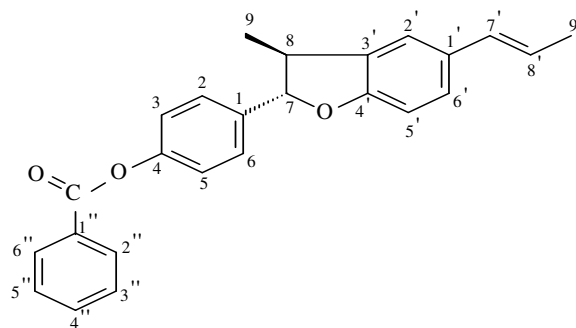


FIGURA 54 -Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  (75 MHz/ $\text{CDCl}_3$ ) do composto BEN – CON

Conocarpano benzoilado (**52**)TABELA 26 – Valores dos deslocamentos químicos ( $\delta$ ) de RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  para o conocarpano e o composto BEN-CON.

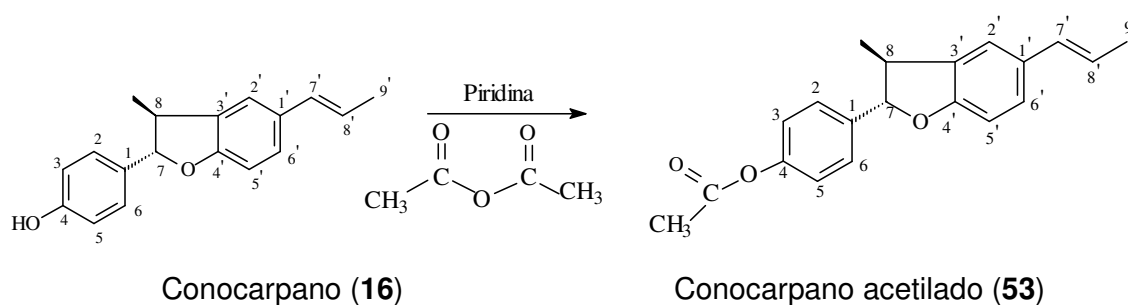
<i>CONOCARPANO (CDCl<sub>3</sub>)</i>			COMPOSTO BEN-CON (CDCl <sub>3</sub> )	
POSIÇÃO	$\delta_{\text{C}} \text{ PM}$	$\delta_{\text{H}} \text{ PPM}$	$\delta_{\text{C}} \text{ PM}$	$\delta_{\text{H}} \text{ PPM}$
C <sub>1</sub>	131,3	-	131,41	-
C <sub>2</sub>	127,9	7,28(d, $J = 8,5$ Hz)	127,20	7,25 (d, $J = 6,67$ Hz)
C <sub>3</sub>	115,4	6,80(d, $J = 8,6$ Hz)	121,88	7,51 (d, $J = 7,88$ Hz)
C <sub>4</sub>	155,6	-	150,76	-
C <sub>5</sub>	115,4	6,80 (d, $J = 8,6$ Hz)	121,88	7,51 (d, $J = 7,88$ Hz)
C <sub>6</sub>	127,8	7,28 (d, $J = 8,5$ Hz)	127,20	7,25 (d, $J = 6,67$ Hz)
C <sub>7</sub>	92,6	5,07 (d, $J = 8,9$ Hz)	92,09	5,20 (d, $J = 8,54$ Hz)
C <sub>8</sub>	45,1	3,38 (m)	45,33	3,45 (m)
C <sub>9</sub>	17,8	1,38 (d, $J = 6,8$ Hz)	18,09	1,46 (d- $J = 6,74$ Hz)
C <sub>1'</sub>	132,3	-	132,06	-
C <sub>2'</sub>	120,7	7,13(s)	120,76	7,15 (d, $J = 6,67$ Hz)
C <sub>3'</sub>	132,7	-	133,63	-
C <sub>4'</sub>	158,1	-	158,23	-
C <sub>5'</sub>	109,2	6,76 (d, $J = 8,4$ Hz)	109,28	6,81 (d, $J = 8,62$ Hz)
C <sub>6'</sub>	126,3	7,10 (d, $J = 1,68$ Hz)	126,33	7,15 (d, $J = 6,67$ Hz)
C <sub>7'</sub>	130,7	6,36(dd, $J = 1,6 - 15,7$ Hz)	130,67	6,39 (d, $J = 15,8$ Hz)
C <sub>8'</sub>	123,1	6,09(dd, $J = 6,6 - 15,7$ Hz)	123,12	6,15 (m)
C <sub>9'</sub>	18,4	1,84(dd, $J = 1,6 - 6,6$ Hz)	18,33	1,88 (d, $J = 6,38$ Hz)
C <sub>1''</sub>	-	-	138,43	-
C <sub>2''</sub>	-	-	130,67	8,23 (d - 7,51Hz)
C <sub>3''</sub>	-	-	128,56	7,59 (m)
C <sub>4''</sub>	-	-	130,67	7,59 (m)
C <sub>5''</sub>	-	-	128,56	7,59 (m)
C <sub>6''</sub>	-	-	129,42	7,59 (m)
O - C = O	-	-	165,10	-

NOTAS: multiplicidade dos sinais: s = simpleto, d = duplete, dd = duplo duplete e m = multiplete;  $J$  = constante de acoplamento em Hz, TMS = padrão interno, Solvente = CDCl<sub>3</sub>.

Após a análise dos espectros no IV, RMN<sup>13</sup>C e <sup>1</sup>H concluiu-se que a reação de benzoilação ocorreu satisfatoriamente, formando o derivado do conocarpano, BEN-CON, o qual foi denominado de conocarpano benzoilado. Este composto ainda não foi descrito na literatura, tratando-se portanto de uma estrutura inédita.

### 5.6.3 REAÇÃO DE ACETILAÇÃO

O conocarpano foi acetilado pelo anidrido acético na presença de piridina anidra. A reação ocorreu inicialmente com o ataque nucleofílico da piridina ao carbono da carbonila do anidrido, formando-se o ânion acetato e um derivado da piridina, que logo em seguida reagiu com o OH do conocarpano formando o éster do conocarpano ACE-CON e regenerando a piridina. O produto da reação foi purificado por cromatografia em coluna. Obteve-se 0,031 g (0,101 mMol) do produto da reação, o qual foi denominado de ACE-CON, com um rendimento 38,27 % solúvel em diclorometano e clorofórmio. O ACE-CON foi caracterizado por IV, RMN <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C<sup>135</sup> (Figuras 55, 56 e 57).



Observou-se no espectro no IV (Figura 55) o desaparecimento da banda de absorção na região de 3.650 à 3.584 cm<sup>-1</sup> de estiramento de deformação axial OH e o aparecimento de uma banda de absorção intensa e aguda em 1765 cm<sup>-1</sup> correspondente ao estiramento deformação axial de C = O da carbonila de éster. A presença de bandas de absorções de fraca intensidade em 2.962 e 2.926 cm<sup>-1</sup> resultante de deformações axiais assimétricas de C – H e em 2.878 cm<sup>-1</sup> banda de deformação axial simétrica de C – H do grupamento metila. Na região de 1.195 cm<sup>-1</sup> observa-se uma banda de forte intensidade referente à deformação axial de acetato C – C (= O) – O. Em 1.609 cm<sup>-1</sup>

banda de deformação axial das ligações C=C de aromático. Observa-se em  $1.485\text{ cm}^{-1}$  banda de vibração de deformação angular assimétrica de C-H e em  $1.369\text{ cm}^{-1}$  banda de vibração de deformação angular simétrica de C-H dos grupamentos metilas. Em  $967\text{ cm}^{-1}$  banda de deformação angular fora do plano das ligações C – H do anel aromático.

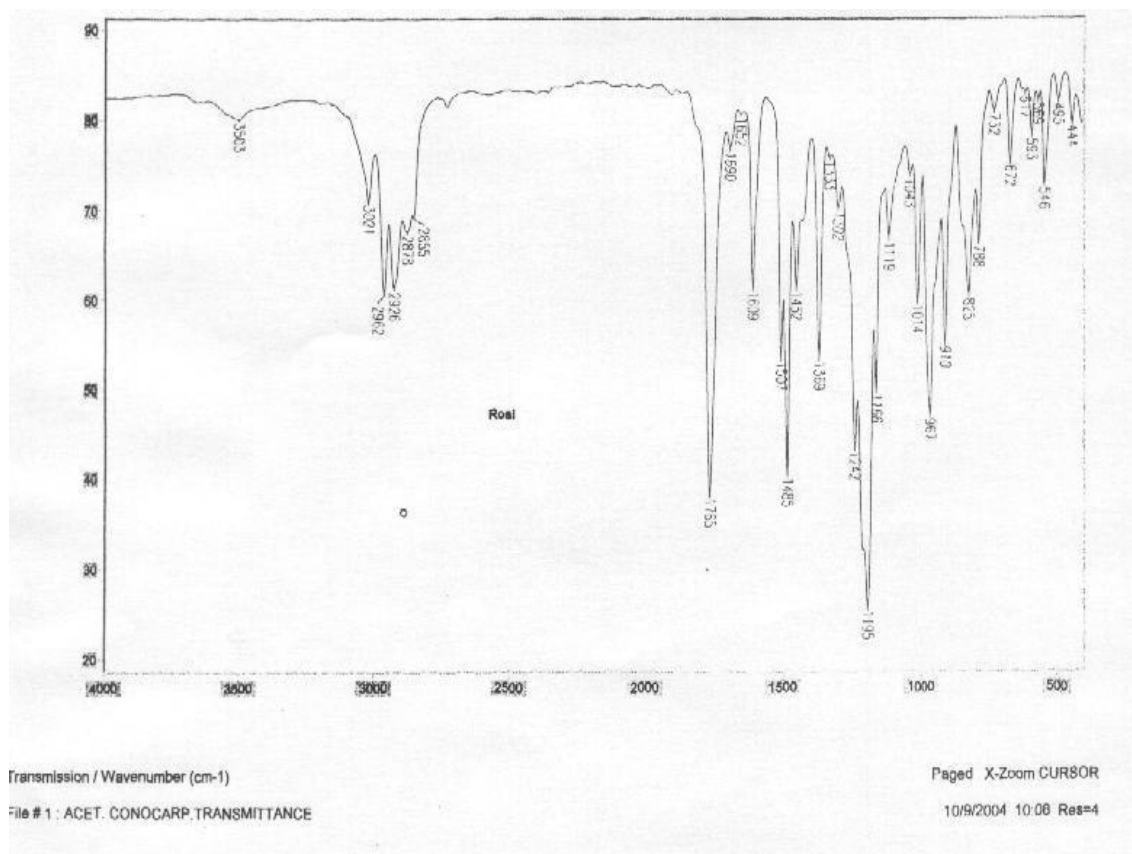


FIGURA 55 - Espectro no IV do composto ACE-CON

Observou-se no espectro de RMN<sup>1</sup>H (Figura 56) o aparecimento do sinal em forma de simpleto em 2,30  $\delta$  referente a metila ligada a carbonila, sugerindo que a reação química ocorreu e o composto ACE-CON foi formado. Os outros deslocamentos químicos ( $\delta$ ) dos demais hidrogênios estão demonstrados na tabela 27 abaixo.



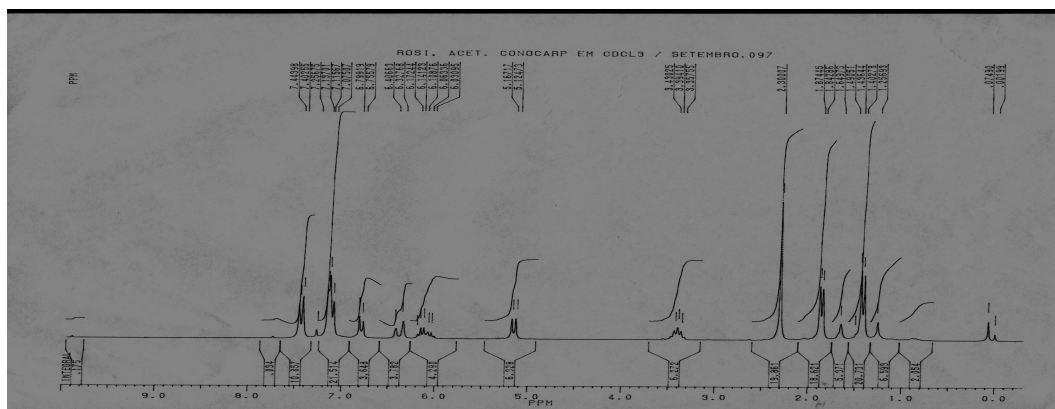


FIGURA 56 - Espectro de RMN  $^1\text{H}$  (300 MHz/  $\text{CDCl}_3$ ) do composto ACE-CON

O espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  (Figura 57) apresentou dois sinais característicos da acetilação, em 165,36  $\delta$  e em 17,02  $\delta$  atribuídos a carbonila ( $\text{C} = \text{O}$ ) e a metila. Os outros deslocamentos químicos estão inclusos na tabela 27 abaixo.

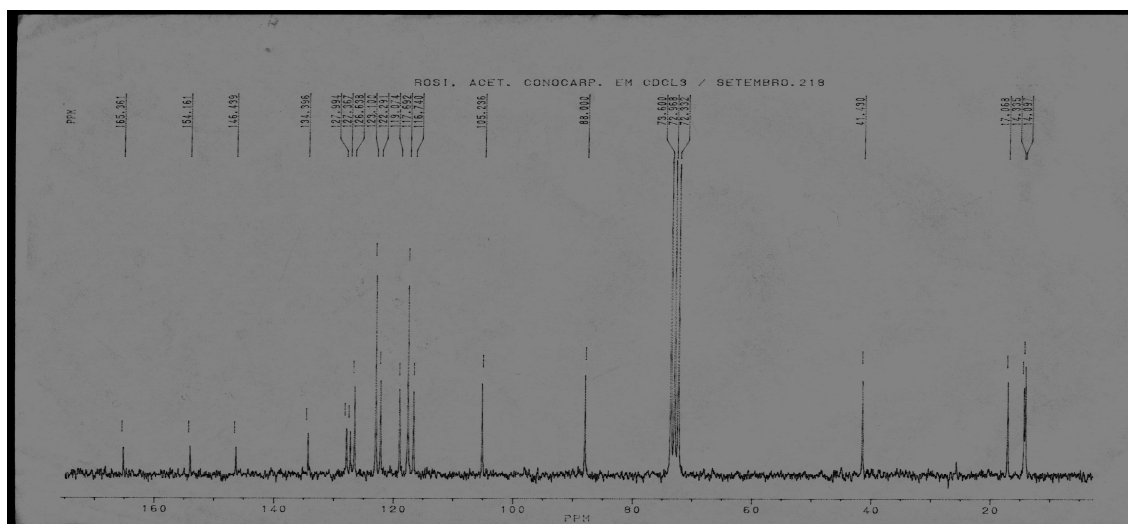
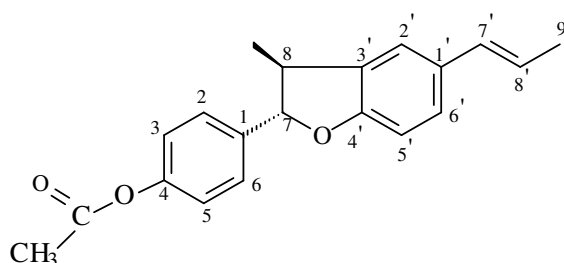


FIGURA 57 - Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  (75 MHz/ $\text{CDCl}_3$ ) do composto ACE – CON

Após a análise dos espectros no IV, RMN<sup>13</sup>C e <sup>1</sup>H concluiu-se que a reação de acetilação ocorreu, formando-se o derivado do conocarpano acetilado, qual foi denominado de ACE-CON. Este composto ainda não foi descrito na literatura, tratando-se portanto de uma estrutura inédita.



Conocarpano acetilado (**53**)

TABELA 27 – Valores dos deslocamentos químicos ( $\delta$ ) de RMN <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C para o conocarpano e o composto ACE-CON

POSICÃO	CONOCARPANO (CDCl <sub>3</sub> )		COMPOSTO ACE-CON (CDCl <sub>3</sub> )	
	$\delta_c$ PM	$\delta_H$ PPM	$\delta_c$ PM	$\delta_H$ PPM
C <sub>1</sub>	131,3	-	134,4	-
C <sub>2</sub>	127,9	7,28(d, $J$ = 8,5 Hz)	123,10	7,13 (d, $J$ = 4,26 Hz)
C <sub>3</sub>	115,4	6,80(d, $J$ = 8,6 Hz)	117,69	7,42 (d, $J$ = 8,28 Hz)
C <sub>4</sub>	155,6	-	146,44	-
C <sub>5</sub>	115,4	6,80 (d, $J$ = 8,6 Hz)	117,69	7,42 (d, $J$ = 8,28 Hz)
C <sub>6</sub>	127,8	7,28 (d, $J$ = 8,5 Hz)	123,10	7,13 (d, $J$ = 4,26 Hz)
C <sub>7</sub>	92,6	5,07 (d, $J$ = 8,9 Hz)	88,00	5,14 (d, $J$ = 8,48 Hz)
C <sub>8</sub>	45,1	3,38 (m)	41,43	3,40 (m)
C <sub>9</sub>	17,8	1,38 (d, $J$ = 6,8 Hz)	14,33	1,42(d, $J$ = 6,73 Hz)
C <sub>1'</sub>	132,3	-	127,36	-
C <sub>2'</sub>	120,7	7,13 (s)	119,07	7,07 (s)
C <sub>3'</sub>	132,7	-	127,99	-
C <sub>4'</sub>	158,1	-	154,16	-
C <sub>5'</sub>	109,2	6,76 (d, $J$ = 8,4 Hz)	105,23	6,78 (d, $J$ = 8,68 Hz)
C <sub>6'</sub>	126,3	7,10 (d, $J$ = 1,68 Hz)	122,29	7,14 (t)
C <sub>7'</sub>	130,7	6,36(d, $J$ = 1,6 -15,7 Hz)	126,63	6,37 (d, $J$ = 15,79 Hz)
C <sub>8'</sub>	123,1	6,09(dd, $J$ = 6,6 -15,7 Hz)	122,29	6,10 (m)
C <sub>9'</sub>	18,4	1,84(dd, $J$ = 1,6 – 6,6 Hz)	14,09	1,86 (d, $J$ = 6,31Hz)
C = O	-	-	165,36	-
CH <sub>3</sub>	-	-	17,07	2,30 (s)

NOTAS: multiplicidade dos sinais: s = simpleto, d = duplete, dd = duplo duplete, m = multipeto; solvente = CDCl<sub>3</sub>; TMS = padrão interno,  $J$  = constante de acoplamento em Hertz.

## 5.7 SÍNTESE DE ANÁLOGOS DO CONOCARPANO

Os vegetais são fontes importantes de substâncias biologicamente ativas, as quais são produzidas no seu metabolismo secundário, às vezes em pequenas quantidades. Diversas classes de metabólitos secundários têm sido empregadas como matéria-prima para a síntese de diferentes substâncias bioativas como os monoterpenos e os fenilpropanóides na síntese de antimalárias, antineoplásicos<sup>109</sup>.

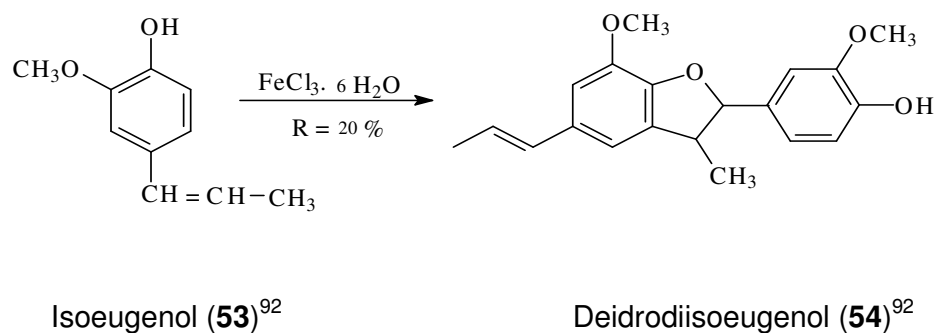
Atualmente, metade dos 25 medicamentos mais vendidos no mundo tem sua origem em metabólitos secundários de origem vegetal. O taxol (9 ver pág. 5) é um exemplo, o qual encontra-se presente em pequenas quantidades nas cascas da árvore *Taxus brevifolia*, aproximadamente 100 mg/Kg de casca seca. Desta maneira para a produção de uma 1,0 g de taxol são necessárias três árvores. Outros fatores como: o crescimento lento, a baixa estatura, a escassa distribuição das árvores no globo terrestre e a agressão provocada no vegetal pela retirada das cascas, acabam dificultando a disponibilidade do taxol. Esta problemática relatada com o taxol também ocorre com outros princípios ativos extraídos de outras espécies vegetais, podendo inclusive levá-la a extinção. Diante desta realidade a síntese orgânica de moléculas biotivas tem se tornado um grande desafio para os químicos no sentido de desenvolver e/ou aperfeiçoar rotas de síntese<sup>136</sup>.

Neste contexto, salientamos a síntese das neolignananas benzofurânicas como o conocarpano isolado da espécie vegetal *Piper solmsianum* C.DC.var.*solmsianum* como moléculas bioativas promissoras.

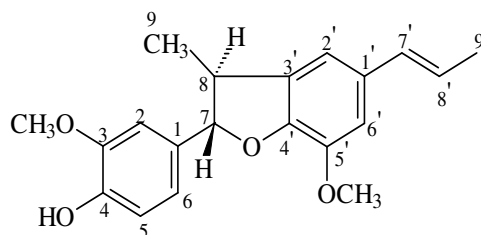
### 5.7.1 Síntese do Diidrodiisoeugenol

O deidrodiisoeugenol foi sintetizado por dimerização catalítica do isoeugenol via acoplamento oxidativo com rendimento somente de 20 %<sup>93</sup>. Por um processo de desidrogenação catalítica, um átomo de hidrogênio foi retirado do grupo hidroxil do isoeugenol, gerando o radical fenoxil<sup>137</sup>. A reação foi monitorada por CCD e posteriormente, submetida ao processo de purificação por CC e eluição com mistura

de solventes com gradiente crescente de polaridade: hexano: acetato de etila, obtendo-se 380,0 mg de um sólido branco e amorfo, solúvel em acetato de etila, com ponto de fusão 133-134°C, o qual foi denominado de DHDISO. O principal produto desta síntese foi identificado por espectroscopia de RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  <sup>92</sup>.



Esta síntese teve como principal desvantagem a baixa seletividade da reação, com formação de radicais benzil e assim, a formação de subprodutos <sup>92, 132</sup>.



Diidrodiisoeugenol (**54**)<sup>92</sup>

Os dados espectroscópicos de RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  (Figuras 58 e 59) obtidos para o composto DHDISO são semelhantes aos do diidrodiisoeugenol relatado na literatura<sup>92</sup>, os quais estão descritos na tabela 28 abaixo.

TABELA 28 – Comparação dos dados de RMN<sup>13</sup>C e <sup>1</sup>H do composto DHDISO com os dados da literatura<sup>92</sup>

COMPOSTO DHDISO (CDCl <sub>3</sub> )			DEHIDRODIISOEUGENOL <sup>92</sup> (CDCl <sub>3</sub> )	
POSIÇÃO	δ <sub>C</sub> PPM	δ <sub>H</sub> PPM	δ <sub>H</sub> PPM	δ <sub>C</sub>
C <sub>1</sub> (C)	131,51	-	-	-
C <sub>2</sub> (CH)	108,35	6,78 (s)	6,78 (d, <i>J</i> = 8,5 Hz)	-
C <sub>3</sub> (C)	145,21	-	-	-
C <sub>4</sub> (C)	143,58	-	-	-
C <sub>5</sub> (CH)	112,73	6,78 (s)	6,78 (d, <i>J</i> = 8,5 Hz)	-
C <sub>6</sub> (CH)	108,62	6,90 (s)	6,89 (m)	-
C <sub>7</sub> (CH)	93,24	5,10 (d, <i>J</i> = 9,2 Hz)	5,10 ( <i>J</i> = 9,46 Hz)	-
C <sub>8</sub> (CH)	45,13	3,45 (m)	3,45 (m)	-
C <sub>9</sub> (CH <sub>3</sub> )	17,83	1,38 (d, <i>J</i> = 5,82 Hz)	1,38 (d, <i>J</i> = 6,7 Hz)	-
C <sub>1</sub> ' (C)	131,62	-	-	-
C <sub>2</sub> ' (CH)	113,50	6,97 (s)	6,97(d, <i>J</i> = 1,5Hz)	-
C <sub>3</sub> ' (C)	132,70	-	-	-
C <sub>4</sub> ' (C)	146,10	-	-	-
C <sub>5</sub> ' (C)	145,21	-	-	-
C <sub>6</sub> ' (CH)	119,41	6,90 (s)	6,90 (d, <i>J</i> = 1,5 Hz)	-
C <sub>7</sub> ' (CH)	130,36	6,37 (d, <i>J</i> = 15,57 Hz)	6,37 (d, <i>J</i> = 15,0 – 7,15 Hz)	-
C <sub>8</sub> ' (CH)	122,94	6,13 (m)	6,1 (m)	-
C <sub>9</sub> (CH <sub>3</sub> )	16,99	1,87 (d, <i>J</i> = 5,34 Hz)	1,87 (dd, <i>J</i> = 6,56 - 1,6 Hz)	-
OCH <sub>3</sub>	55,39	3,88 (s)	3,88 (s)	-
OH (fenol)	-	5,66 (s)	5,80 (s)	-

NOTAS: s = simpleto, d = duplete, dd = duplo duplete e m = multiplete; *J* = constante de acoplamento em Hz, TMS = padrão interno, Solvente = CDCl<sub>3</sub>.

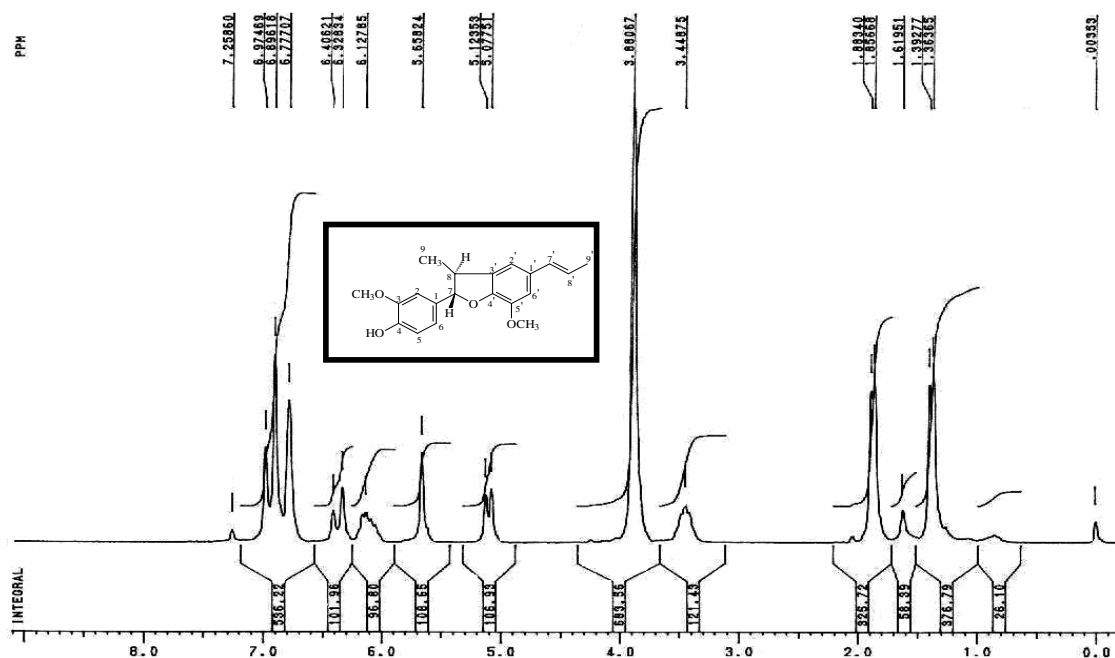


FIGURA 58 - Espectro de RMN <sup>1</sup>H (300 MHz/ CDCl<sub>3</sub>) do composto DHDISO

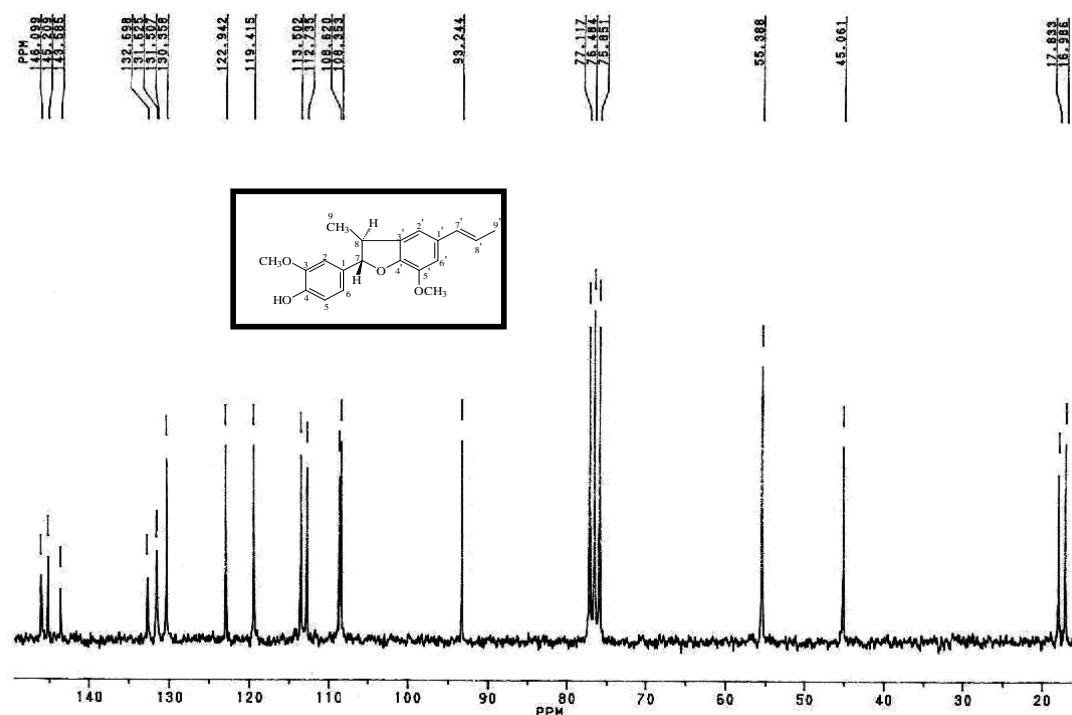
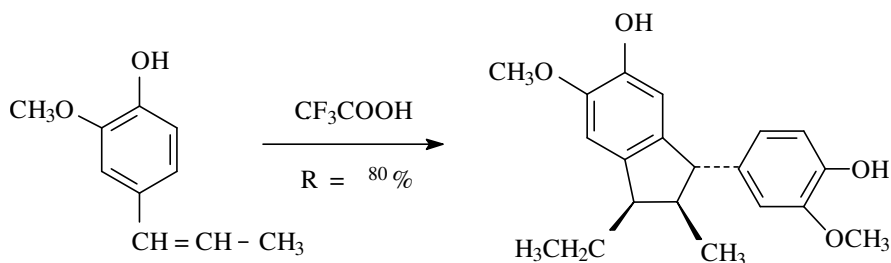


FIGURA 59 - Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$  /75 MHz) do composto DHDISO

### 5.7.2 Síntese do $\alpha$ -Di-Isoeugenol<sup>92,93</sup>

O  $\alpha$ -di-isoeugenol foi sintetizado pela reação de dimerização do isoeugenol em solução diluída de ácido trifluoroacético em clorofórmio. O mecanismo de reação para a síntese do  $\alpha$ -di-isoeugenol é similar ao descrito para a síntese do deidrodiisoeugenol (**ver p. 152**)<sup>93</sup>. No entanto, é importante ressaltar que nestas condições de reação, o radical fenoxil é mais estável e a reação é mais seletiva, tendo um rendimento de 80 %.

O produto da reação foi obtido pelo processo de cristalização com os solventes hexano: acetato de etila, ocorrendo a precipitação de 552 mg de cristais incolores alongados, solúveis em acetato de etila e com ponto de fusão entre 179 – 180°C do composto, o qual foi denominado de DIEU. O composto DIEU foi identificado por espectroscopia de RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ <sup>92</sup>.

Isoeugenol (**53**)<sup>92,93</sup> $\alpha$  - di - isoeugenol (**55**)<sup>92,93</sup>

Os dados espectroscópicos de RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  (figuras 60 e 61) obtidos para o composto DIEU são semelhantes aos do  $\alpha$  - di - isoeugenol relatado na literatura<sup>92</sup>, os quais estão descritos na tabela 29 abaixo.

TABELA 29 – Comparação dos dados de RMN $^{13}\text{C}$  e  $^1\text{H}$  do composto DIEU com os dados da literatura<sup>91</sup>

COMPOSTO DIEU ( $\text{CDCl}_3$ )			SÍNTESE $\alpha$ - DI - ISOEUGENOL ( $\text{CDCl}_3$ )
POSICÃO	$\delta_{\text{C}}$ PPM	$\delta_{\text{H}}$ PPM	$\delta_{\text{H}}$ PPM
9 - H	12,48	0,95 (d, $J = 7,34$ Hz)	0,97 (t, $J = 7,4$ Hz)
10 - H	14,05	1,03(d, $J = 7,22$ Hz)	1,03 (d, $J = 6,9$ Hz)
8 <sup>a</sup> - H	22,62	1,35 (m)	1,38 (ddq, $J = 13,3; 8,8$ e $7,4$ Hz)
8b - H	-	1,70 (m)	1,70 (ddq, $J = 13,3; 7,4$ e $5,6$ Hz)
2 - H	49, 48	2,48 (m)	2,46 (ddq, $J = 9,5; 7,5$ e $5,6$ Hz)
1 - H	48,75	2,91(m)	2,91 (ddq, $J = 8,8; 7,5$ e $5,6$ Hz)
3 - H	56, 37	3,73 (d, $J = 9,5$ Hz)	3,74 (d, $J = 9,5$ Hz)
OCH <sub>3</sub> -5	56,97	3,90 (s)	3,89 (s)
OCH <sub>3</sub> . 3'	56,37	3,81 (s)	3,75 (s)
OH	-	5,48 (s)	5,52 (s) e 5,56 (s)
4' - H	144, 33	-	-
3' - H	144,76	-	-
7 - H	139,39	-	-
4 - H	139,96	-	-
5 - H	145, 29	-	-
6 - H	146, 70	-	-
2' - H	107, 74	6,48 (s)	6,48 (s)
6' - H	121,74	6,62 (s)	6,62 (d, $J = 1,9$ Hz)
7 - H	110, 88	6,67 (d, $J = 1,56$ Hz)	6,65 (dd, $J = 8,0$ e $1,9$ Hz)
5' - H	114, 23	6,77 (s)	6,77 (s)
11-H	111, 25	6,84 (d, $J = 7,91$ Hz)	6,84 (d, $J = 8,0$ Hz)
12-H	136,08	-	-

NOTAS: multiplicidade dos sinais: s = simpleto, d = duplete, dd = duplo duplete e m = multiplete;  $J$  = constante de acoplamento em Hz, TMS = padrão interno, Solvente =  $\text{CDCl}_3$ .

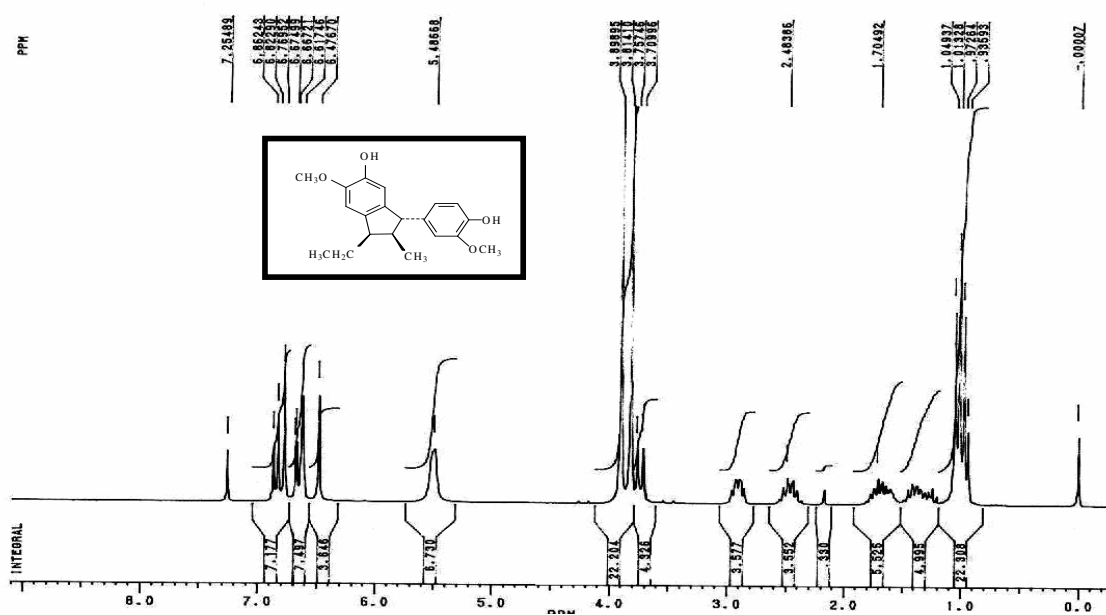


FIGURA 60 - Espectro de RMN <sup>1</sup>H (300 MHz/CDCl<sub>3</sub>) do composto DIEU

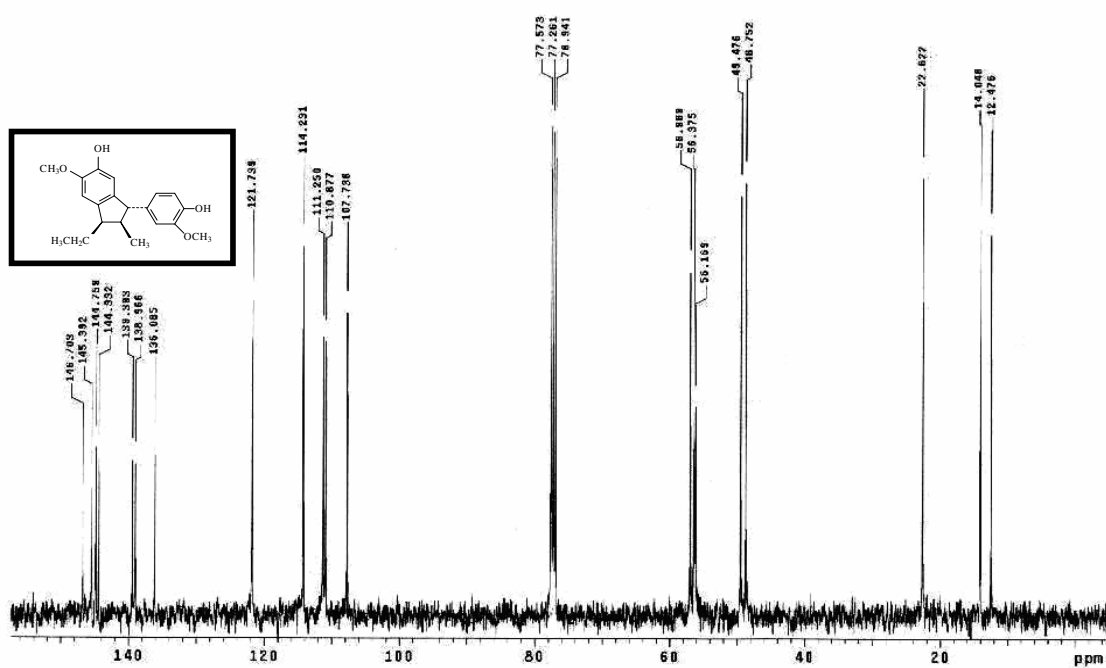


FIGURA 61 - Espectro de RMN <sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub> /75 MHz) do composto DIEU



## 5.8 CONTROLE DE QUALIDADE SAZONAL DA ESPÉCIE VEGETAL *PIPER SOLMSIANUM* C.DC. VAR. *SOLMSIANUM*

Desde 1980, a Organização Mundial da Saúde vem incentivando os países para identificar e explorar a medicina tradicional e a fitoterapia<sup>136</sup>.

No entanto, inúmeras plantas que são usadas em preparações fitoterápicas carecem de um maior controle de qualidade, uma vez que a literatura científica indica que muitas destas podem apresentar substâncias tóxicas ou composição química variável<sup>138,139</sup>.

Os métodos cromatográficos são as técnicas de eleição utilizadas para a padronização química de plantas medicinais e suas fitopreparações (extratos, tinturas, etc...) as quais baseiam-se nas concentrações das substâncias marcadoras químicas presentes no extrato vegetal concentrado ou frações com alta resolução e sensibilidade<sup>28</sup>.

A cromatografia gasosa de alta resolução (CG/FID) e a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) são ferramentas analíticas poderosas para identificar e/ou monitorar a presença destes marcadores químicos em extratos brutos ou frações, nos fornecendo um perfil cromatográfico<sup>97, 138,139</sup>.

Diante do exposto, verificou-se a necessidade de ampliar os estudos da *Piper solmsianum* C.DC, variedade *solmsianum*, tendo como meta o controle de qualidade visando à quantificação dos marcadores químicos sazonais presentes nos extratos vegetais concentrados, utilizando a técnica de cromatografia gasosa de alta resolução com detector de ionização de chama (CG-FID) para os marcadores químicos menos polares (neolignanas) e a cromatografia líquida de alta eficiência para os marcadores químicos polares (flavonóides).

### 5.8.1 Rendimento dos Extratos Obtidos

Conforme metodologia descrita em materiais e métodos ( **ver p. 79**) a massa e os rendimentos brutos obtidos dos extratos de hexano (HEX), diclorometano (DCM) e

acetato de etila (AE) dos diversos órgãos vegetais secos (raiz, caule, folha e flor) das 4 coletas do ano (primavera, verão, outono e inverno) da espécie vegetal *Piper solmsianum* C.DC. var. *solmsianum*, verificou-se que os extratos dos caules tanto em acetato de etila, como em hexano e diclorometano apresentaram os menores rendimentos em massa quando comparados com os demais órgãos vegetais. Em contrapartida, as raízes foram os órgãos vegetais com os melhores rendimentos em massa. Os extratos das folhas do outono, seguido dos extratos das folhas do verão, primavera e inverno em diclorometano tiveram também um bom rendimento. O extrato das flores da primavera em hexano teve um rendimento razoável. Quando se compara o rendimento dos extratos em diclorometano e hexano, observou-se que os extratos em diclorometano tiveram melhores rendimentos que os extratos em hexano.

Portanto, o diclorometano demonstrou ser o solvente que melhor extraiu os constituintes químicos de menor polaridade, como é o caso das neolignanas. Diante destas informações podemos correlacionar os dados de massas obtidos dos extratos com a atividade antinociceptiva e antimicrobiana pois foi constatado que a fração diclorometano foi uma das mais ativas.

Quando se comparam os extratos em acetato de etila dos diversos órgãos vegetais verifica-se que os extratos das flores da primavera foram os com melhores rendimentos em massa seguido das flores de inverno, verão e outono tiveram melhores rendimentos que os demais extratos dos demais órgãos vegetais. Nestas condições, as flores demonstram ser o órgão vegetal com maior riqueza de constituintes químicos, ao contrário, os caules demonstraram ser os órgãos vegetais com menor concentração de constituintes químicos. Estes dados estão descritos na tabela 30 e ilustrados na figura 62.

TABELA 30 – Rendimento bruto obtido dos extratos de HEX, DCM e AE obtidas *Piper solmsianum* dos diferentes órgãos vegetais coletados nas 4 estações do ano

MASSA DE EXTRATO EM g/100g DE PLANTA SECA E PERCENTUAL DE RENDIMENTO							
ÓRGÃO	PERÍODO	HEX (g)	% HEX	DCM (g)	% DCM	AE	% AE
Folha	Inverno	0,077	1,5	0,229	4,57	0,032	0,64
Folha	Primavera	0,094	1,89	0,264	5,28	0,036	0,72
Folha	Verão	0,074	1,47	0,296	5,92	0,047	0,94
Folha	Outono	0,053	1,05	0,300	6,01	0,044	0,88
Flor	Inverno	0,046	0,92	0,298	5,95	0,104	2,08
Flor	Primavera	0,237	4,74	0,345	6,89	0,213	4,27
Flor	Verão	0,096	1,92	0,616	12,32	0,075	1,51
Flor	Outono	0,065	1,30	0,329	6,57	0,069	1,37
Raiz	Inverno	0,113	2,26	0,128	2,55	0,016	0,32
Raiz	Primavera	0,092	1,84	0,110	2,20	0,015	0,29
Raiz	Verão	0,084	1,67	0,117	2,35	0,014	0,27
Raiz	Inverno	0,033	0,66	0,029	0,59	0,029	0,24
Caule	Outono	0,122	2,44	0,177	3,55	0,019	0,37
Caule	Primavera	0,035	0,708	0,031	0,63	0,011	0,23
Caule	Verão	0,029	0,57	0,028	0,56	0,014	0,27
Caule	Outono	0,041	0,82	0,039	0,78	0,014	0,27

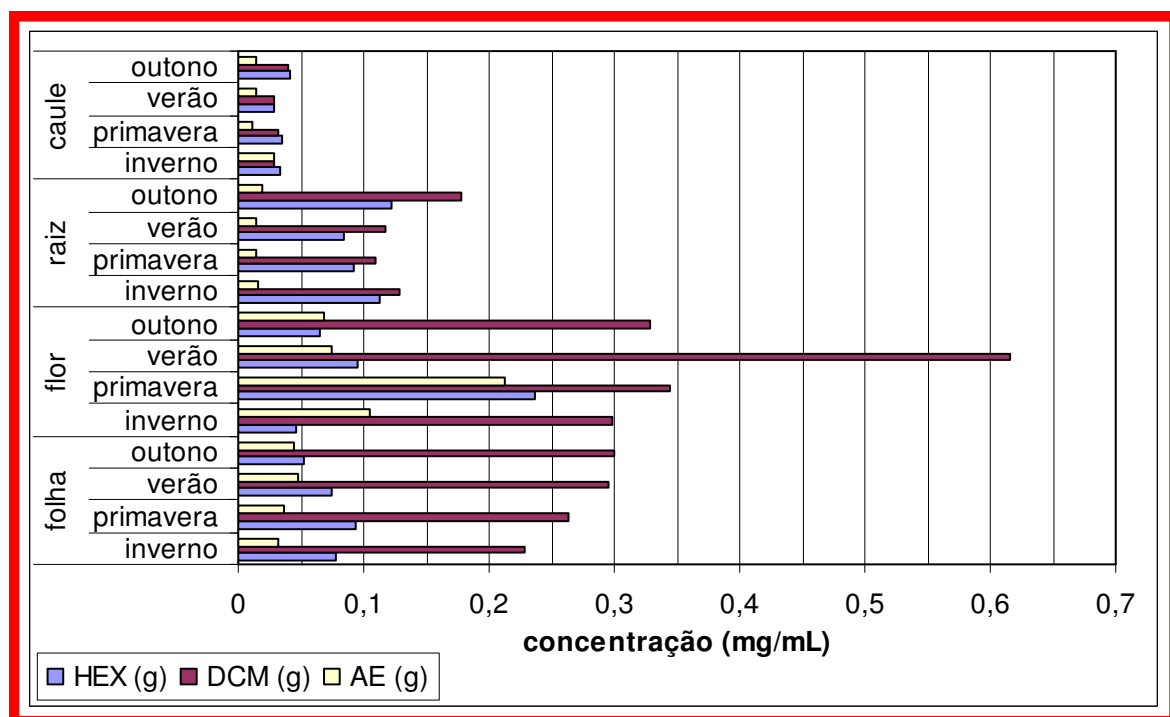


FIGURA 62 - Rendimento bruto (mg/mL) obtido dos extratos de HEX, DCM e AE dos diferentes órgãos da *P. solmsianum* coletados nas 4 estações do ano.

Observando-se os dados expostos na tabela 30 e figura 62, demonstrados acima, pelos percentuais de rendimentos obtidos, existem diferenças significativas de uma estação do ano para outra e de órgão vegetal para órgão vegetal, sendo que o extrato em diclorometano das flores de verão foi o que obteve maior rendimento quando comparado com os demais extratos em diclorometano e hexano dos demais órgãos nas várias estações do ano. Em contrapartida, os extratos em diclorometano como em hexano e acetato de etila dos caules da *Piper solmsianum*, nas quatro estações do ano foram os que obtiveram os menores rendimentos, indicando provavelmente a baixa concentração de constituintes químicos. Os dados obtidos neste procedimento experimental tornam-se uma ferramenta importante no processo de escolha da época do ano e do órgão vegetal a ser coletado para uma futura investigação fitoquímica, a qual vise o isolamento dos constituintes químicos desta espécie vegetal. Nestas circunstâncias, o caule não deve ser o órgão alvo da pesquisa e sim as flores, seguida das folhas, pois estes órgãos apresentam maiores concentrações de fitoconstituintes. Além destas informações, também ofereceu um direcionamento, com relação ao solvente de escolha no processo extrativo, pois os extratos em diclorometano obtiveram melhores rendimentos do que os em hexano. Portanto, para o isolamento de princípios ativos menos polares, como as neolignanas, o diclorometano parece ser mais eficiente do que o hexano.

#### 5.8.2 Análises das Frações Hexânica e Diclorometano por CG/FID

Foram analisadas por cromatografia gasosa equipado com detector de ionização de chama CG/FID 32 amostras referentes as soluções dos extratos hexano (HEX) e diclorometano (DCM) dos órgãos vegetais (raiz, caule, folha e flor) coletados nas 4 estações do ano da espécie vegetal *P. solmsianum* visando a determinação das concentrações dos marcadores químicos sazonais: as neolignanas conocarpano (**15**), eupomatenóide-3 (**24**) e eupomatenóide-5 (**16**), as quais foram determinadas das suas curvas de calibrações foram plotadas baseadas nas análises da equação da regressão

linear ( $Y = A + BX$ ) das áreas dos picos versus as concentrações ( $\mu\text{g/mL}$ ) injetadas em CG/FID<sup>140, 141, 142, 143</sup>. As concentrações do conocarpano ( $\text{mg/mL}$ ) nas frações hexânica e diclorometano estão demonstradas na tabela 31 e figura 63.

TABELA 31 – Concentração do conocarpano ( $\text{mg/mL}$ ) nas frações HEX e DCM

<i>CONCENTRAÇÃO DO CONOCARPANO</i>					
ÓRGÃO	PERÍODO	HEX ( $\text{mg/mL}$ )	DESVIO PADRÃO ( $\text{mg/mL}$ )	DCM ( $\text{mg/mL}$ )	DESVIO PADRÃO ( $\text{mg/mL}$ )
Folha	Inverno	0,160	0,001	0,926	0,018
Folha	Primavera	0,273	0,009	0,970	0,068
Folha	Verão	0,268	0,029	0,995	0,026
Folha	Outono	0,026	0,001	0,501	0,021
Flor	Inverno	0,085	0,004	0,566	0,026
Flor	Primavera	0,405	0,010	1,389	0,052
Flor	Verão	0,403	0,009	1,505	0,032
Flor	Outono	0,331	0,020	0,534	0,016
Raiz	Inverno	0,526	0,022	1,576	0,042
Raiz	Primavera	1,049	0,042	0,937	0,032
Raiz	Verão	1,267	0,023	1,455	0,038
Raiz	Outono	1,360	0,035	1,779	0,038
Caule	Inverno	0,014	0,001	0,004	0,000
Caule	Primavera	0,030	0,002	0,002	8,36E-05
Caule	Verão	0,018	0,000	0,002	0,000
Caule	Outono	0,008	0,001	0,005	0,000

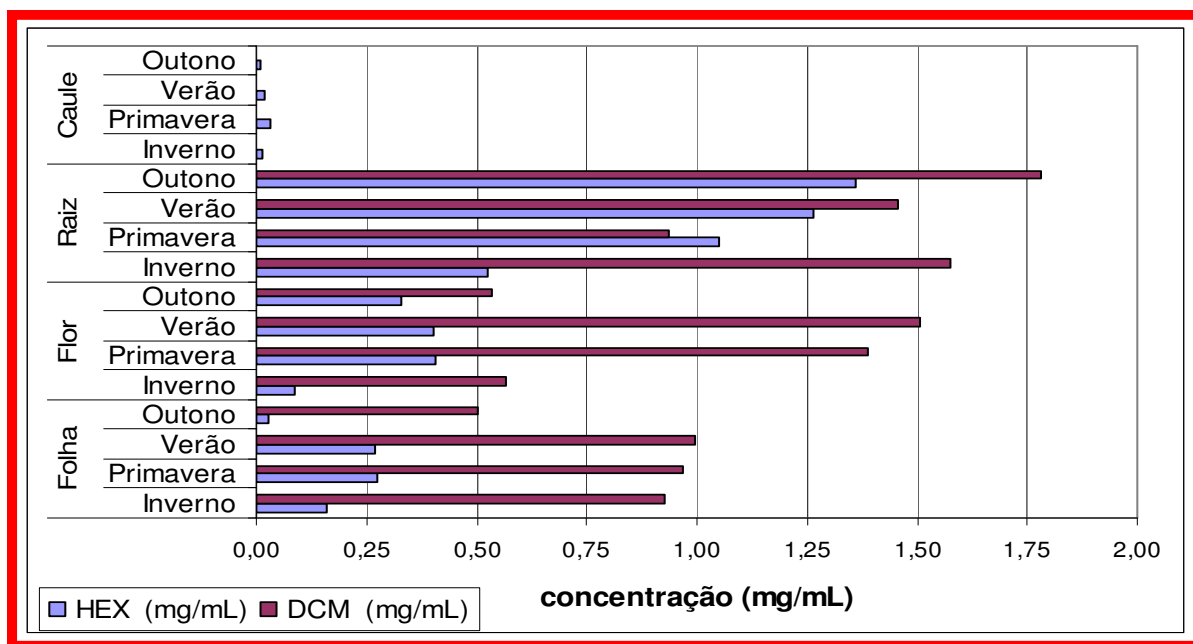


FIGURA 63 - Concentração do conocarpano (mg/mL) nas frações HEX e DCM por CG/FID.

Analisando-se os dados expostos na tabela 31 e figura 63, com relação à quantificação do conocarpano nos diversos órgãos vegetais das quatro estações do ano, confirmam os comentários expostos anteriormente. O extrato em diclorometano das flores da *Piper solmsianum* coletadas no verão, seguido da primavera apresentam maiores concentrações de conocarpano em relação aos demais extratos dos outros órgãos e épocas do ano. Ao contrário, os extratos em diclorometano e hexano apresentaram apenas traços deste marcador químico. Os dados obtidos confirmam que o diclorometano é muito mais eficiente do que o hexano no processo extrativo. Os caules não foram analisados na presente pesquisa, pois os resultados obtidos nas análises mostraram concentrações abaixo do limite de quantificação pela técnica. Embora, as raízes tenham tido uma elevada concentração do conocarpano, este órgão não deve ser coletado para evitar prejuízos na vida do vegetal.

Os extratos das flores de verão em hexano e das flores de primavera em diclorometano foram analisados visando a comparação da separação dos picos em cada extrato e com os padrões isolados. Como pode ser observado na figura 64 existe similaridade do perfil cromatográfico dos dois extratos<sup>140</sup>.

Analisando-se a superposição dos cromatogramas (figura 64) referentes aos extratos das flores de verão em hexano e das flores de primavera em diclorometano, visando a comparação da separação dos picos no extrato hexânico e DCM e a comparação com os padrões isolados, verificou-se uma similaridade do perfil cromatográfico dos dois extratos<sup>144</sup>.

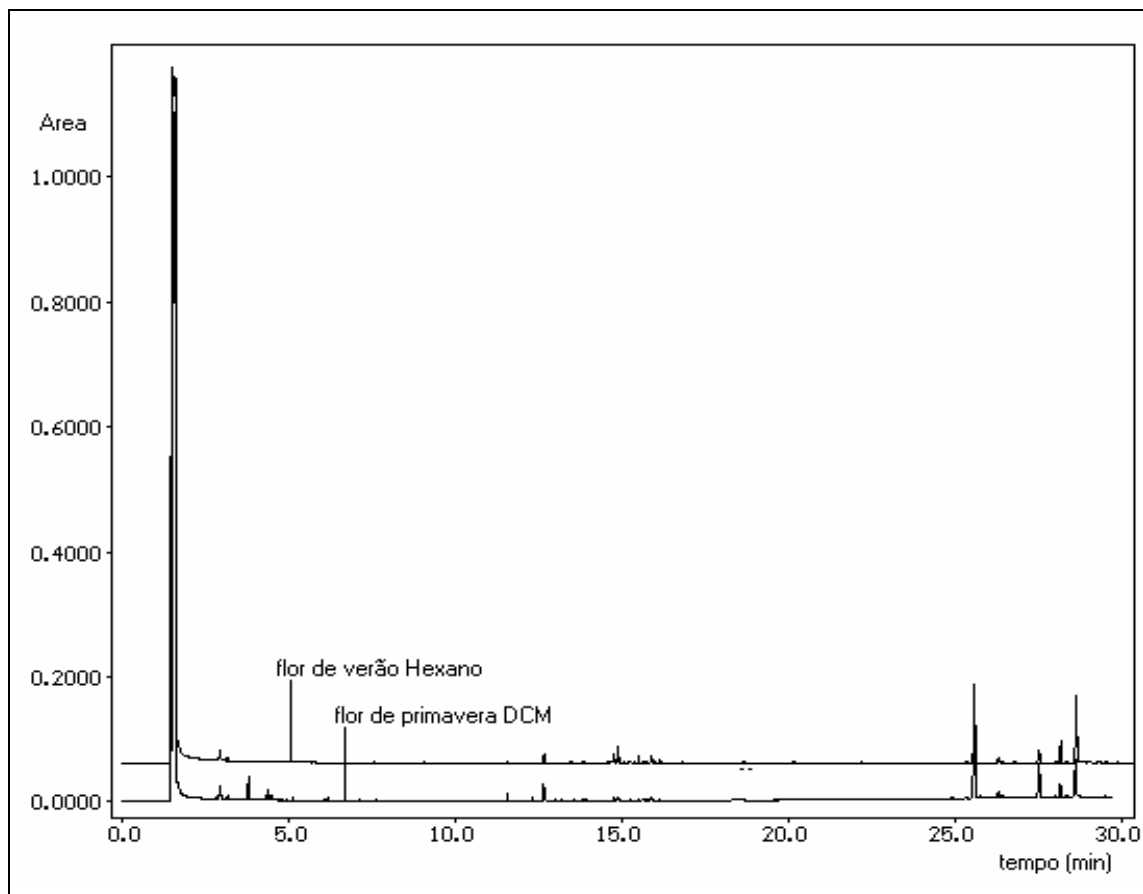


FIGURA 64 - Comparação entre dois extratos - Hexano e DCM

Ampliando-se a área de interesse do cromatograma (Figura 65), que vai de 25 a 30 minutos e comparando-se o cromatograma (Figura 66) do extrato da flor da primavera em diclorometano com os padrões dos marcadores químicos sazonais autênticos: conocarpano, eupomatenóide-3 e eupomatenóide-5 verificou-se que eluíram em 25,5; 28,0 e 28,5 minutos respectivamente. Cruzando-se os dados, a área do pico no cromatograma juntamente com os dados da tabela 31 pode-se afirmar que o conocarpano é o composto majoritário no extrato DCM da flor da primavera. Analisando-se o cromatograma, pode-se observar um pico com tempo de retenção de

27,5 minutos, referente a um composto que não foi isolado e identificado pela presente investigação fitoquímica.

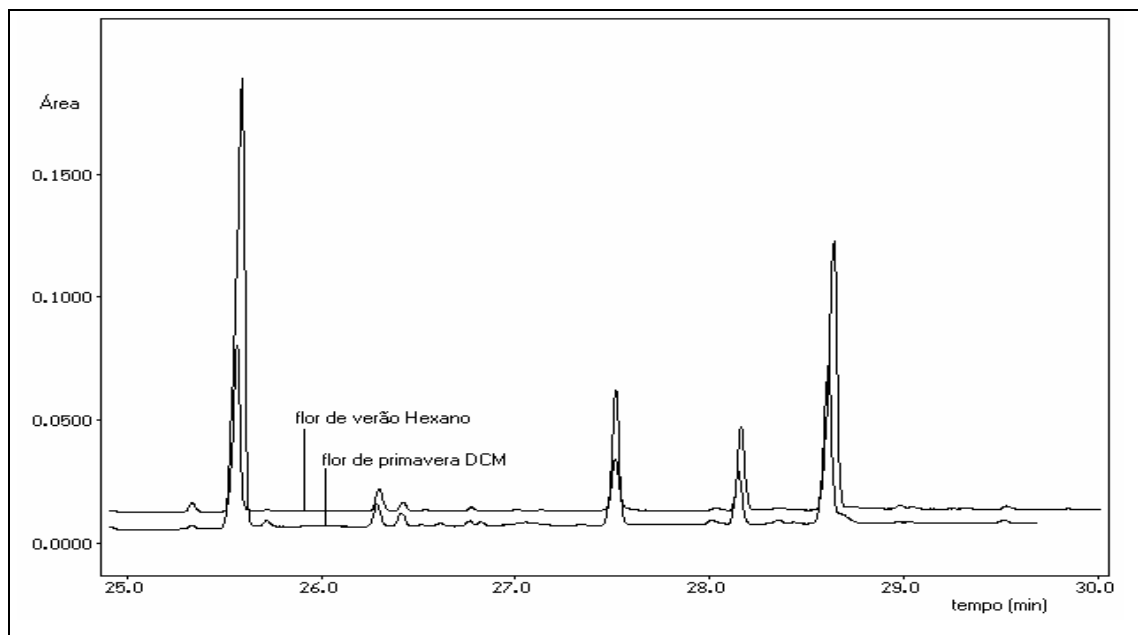


FIGURA 65 - Ampliação da Figura 64 na área de interesse

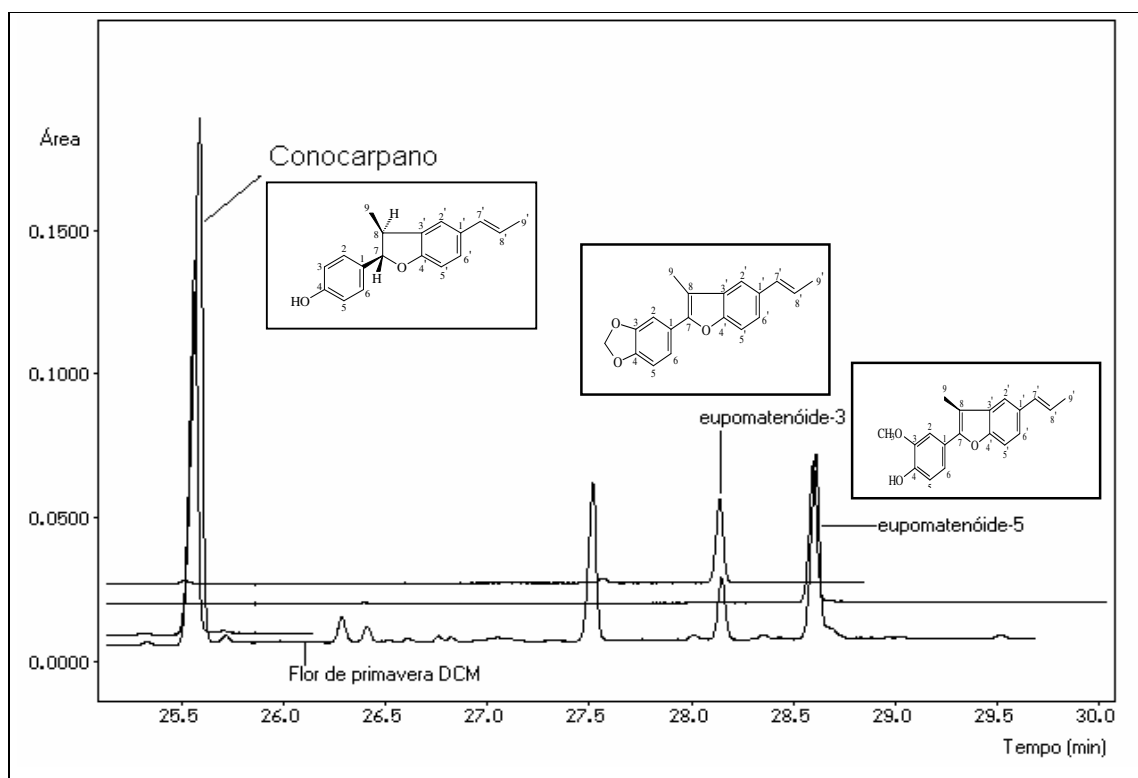




FIGURA 66 - Comparação de um extrato com os padrões dos marcadores

A análise de variância ANOVA mostrou diferenças significativas para os fatores: tipo de extrato, órgão vegetal e estação do ano para as concentrações do conocarpano. Em relação à extração, o diclorometano (DCM) foi eleito o melhor solvente para a extração, pois apresentou 0,9 a 1,1 mg/mL de concentração significativamente maiores do que para o Hexano 0,4 a 0,6 mg/mL. Portanto, a concentração média obtida pelo DCM foi significativamente maior do que para Hexano como pode ser observado na figura 67.

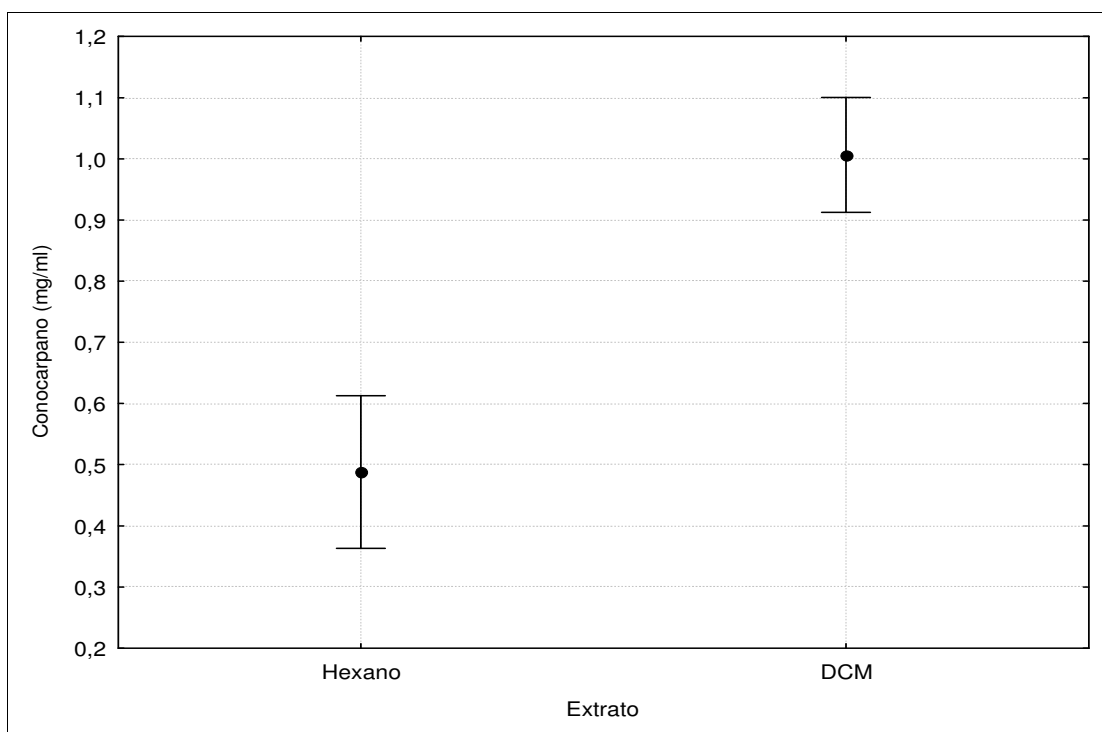


FIGURA 67 - Concentrações médias e intervalos de confiança (barras) de conocarpano (em mg/mL) para os diferentes tipos de extração

Quando analisamos os diversos órgãos vegetais com relação à presença de conocarpano (figura 68 e tabela 31), verificamos que as raízes apresentaram as maiores concentrações deste composto quanto (mg/mL), seguida das flores e folhas, sendo que

todas as concentrações são diferentes entre si. A concentração média obtida na raiz foi significativamente maior do que para as folhas e flores.

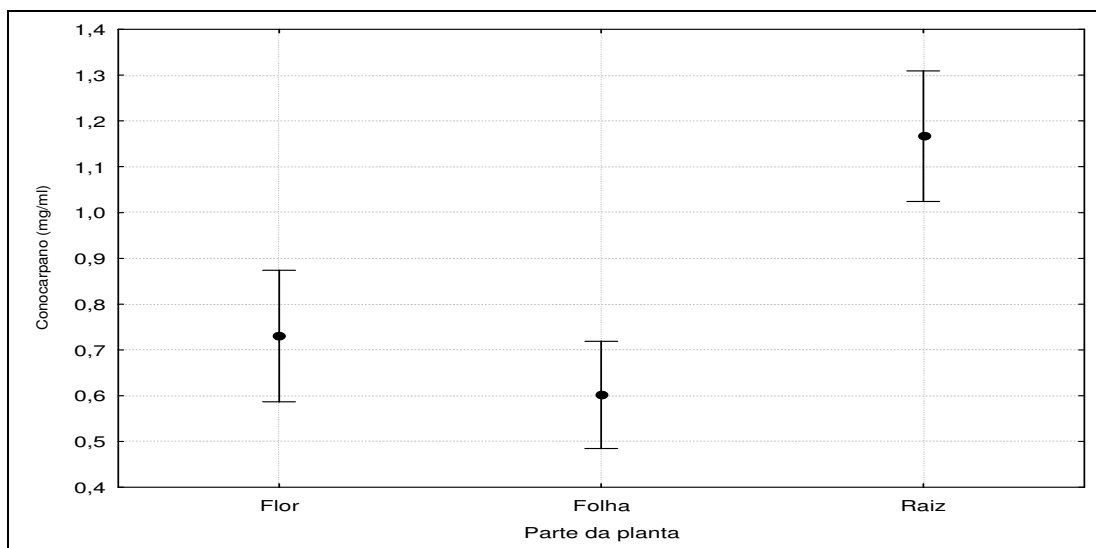


FIGURA 68 - Concentrações médias e intervalos de confiança (barras) de conocarpano (em mg/mL) para as diferentes partes da planta

Comparando-se as quatro estações do ano com relação à concentração do conocarpano, constatou-se que no verão ocorreu a maior concentração média deste composto (Figura 69 e tabela 31), seguida da primavera, outono e inverno sendo todas as médias significativamente diferentes. A concentração média obtida no verão (0,9 a 1,3 mg/mL) foi significativamente maior do que para as outras estações.

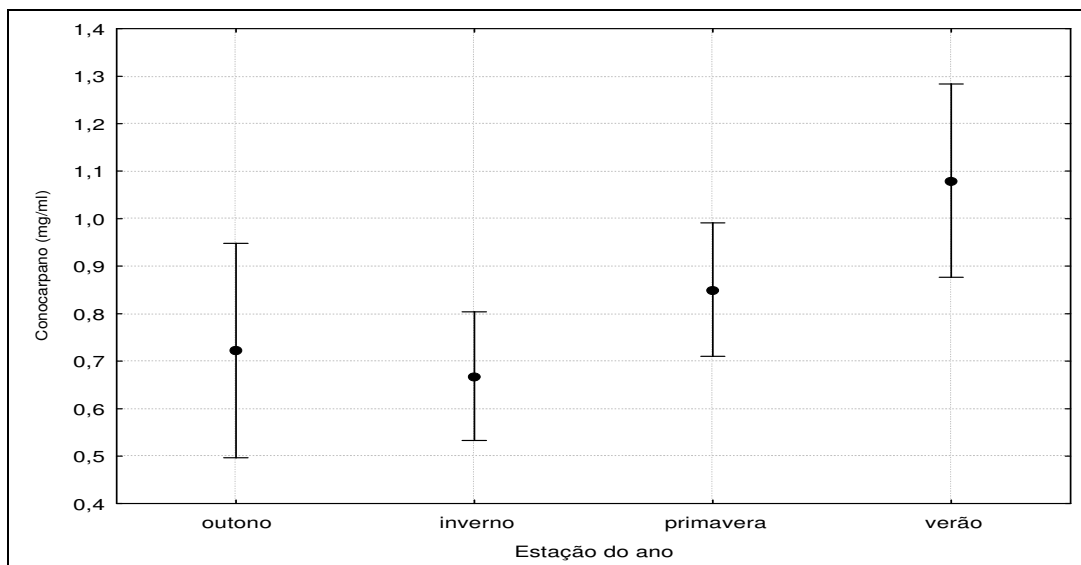


FIGURA 69 - Concentrações médias e intervalos de confiança (barras) de conocarpano (em mg/mL) para as diferentes estações do ano

Quando foram analisados os valores médios e intervalos de confiança para a combinação entre os fatores tipo de extrato, órgão vegetal e estação do ano, verificamos que a maior concentração do conocarpano foi obtida com a extração por diclorometano das raízes do outono 1,779 mg/mL. Além da raiz, outro órgão vegetal com elevada concentração do conocarpano são as flores de verão 1,505 mg/mL e da primavera 1,389 mg/mL.

O extrato das flores da primavera em diclorometano teve uma redução de 21,9 % na concentração do conocarpano em relação ao extrato das raízes de outono. Em contrapartida, o extrato em hexano do caule do outono demonstrou a menor concentração desta neolignana, 0,008 mg/mL. A raiz é um órgão vegetal que exerce as seguintes funções: fixação do vegetal ao solo, absorção de água e sais minerais e a condução da seiva bruta e elaborada. Portanto, este órgão exerce funções que são vitais para a sobrevivência da planta<sup>145</sup>. A sua coleta prejudica o desenvolvimento do vegetal, podendo levá-lo a morte. Sendo assim, quando existir outro órgão vegetal com elevada concentração de fitoconstituintes, deve-se priorizá-lo e evitar a coleta da raiz. Nestas circunstâncias, devemos coletar as flores do verão da espécie vegetal *P. solmsianum* por conter elevada concentração deste composto.

Dados da literatura nos revelam que além do fator econômico e do avanço tecnológico que as plantas com potencial terapêutico possuem, a coleta inadequada das plantas medicinais por parte dos pesquisadores e empresas têm resultado em intenso extrativismo, o que leva ao risco de extinção de inúmeras espécies nativas, causando distúrbios ecológicos e o desaparecimento de plantas, cujo potencial farmacológico e químico não poderá sequer ser estudado<sup>38,146</sup>.

A Figura 70 nos mostra a concentração do conocarpano nos diversos órgãos vegetais nas quatro estações do ano, correlacionando-o com a eficiência do processo extrativo com hexano e diclorometano, visando à extração do conocarpano.

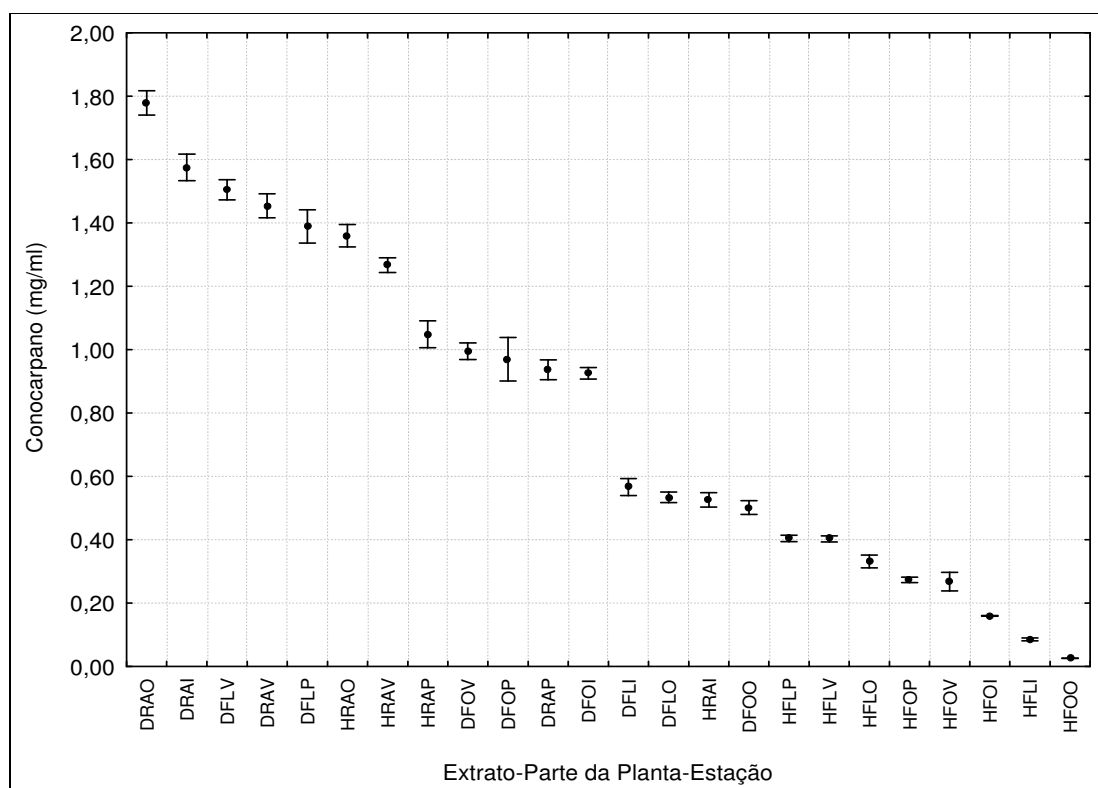


FIGURA 70 - Médias e desvios padrão associados à combinação dos extratos, partes da planta e estações do ano. NOTA: o código utilizado mostra o tipo de

extrato na primeira letra (D-DCM e H-Hexano), a parte da planta nas segundas e terceiras letras (RA-Raiz, FL-Flor e FO-Folha) e a estação do ano na quarta letra (O-Outono, I-Inverno, P-Primavera e V-Verão).

Quando os dados foram analisados considerando-se os rendimentos dos extratos de cada órgão da planta em cada estação do ano, calculou-se em (mg de conocarpano/100g de parte de planta seca). Nesse caso os extratos em diclorometano das flores de verão e primavera apresentaram as maiores massas 0,616 e 0,345 mg/mL respectivamente. Ao contrário, os extratos em hexano e diclorometano dos caules de verão 0,029 e 0,028 mg/mL respectivamente demonstraram rendimentos quase nulo desta neolignana em relação aos demais órgãos. Estes parâmetros estão relatados na Figura 71 e tabela 31.

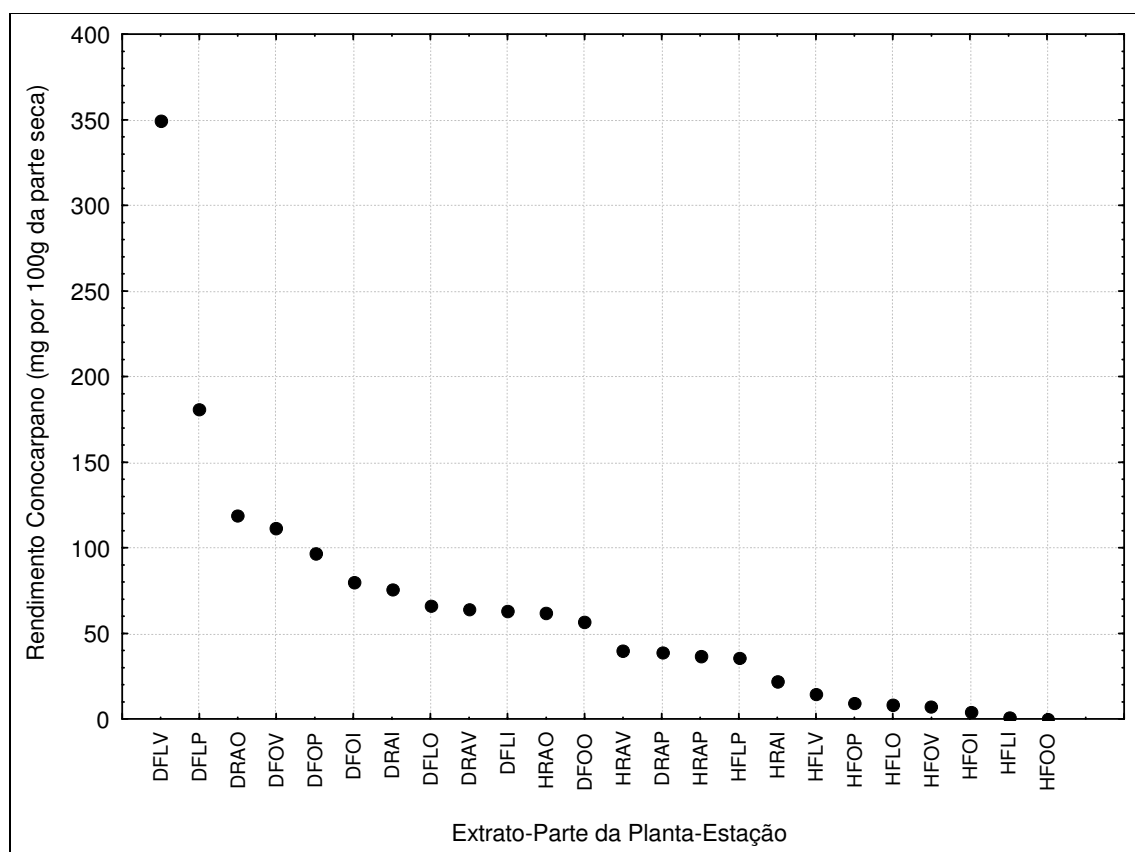


FIGURA 71 - Rendimento médio associado à combinação dos extratos, partes da planta e estações do ano. NOTAS: o código utilizado mostra o tipo de extrato na primeira letra (D-DCM e H-Hexano), a parte da planta nas segundas e terceiras letras (RA-Raiz, FL-Flor e FO-Folha) e a estação do ano na quarta letra (O-Outono, I-Inverno, P-Primavera e V-Verão).

#### 5.8.2.1 Eupomatenóide – 3 como marcador químico

O eupomatenóide-3 apresentou comportamento inverso ao conocarpano em relação ao tipo de extração, pois o hexano demonstrou ser o solvente de eleição para a extração desta neolignana, em virtude dos extratos hexânicos apresentarem maiores concentrações deste composto (mg/mL). As concentrações médias em hexano foram significativamente maiores que em diclorometano e estão relatadas na Figura 72.

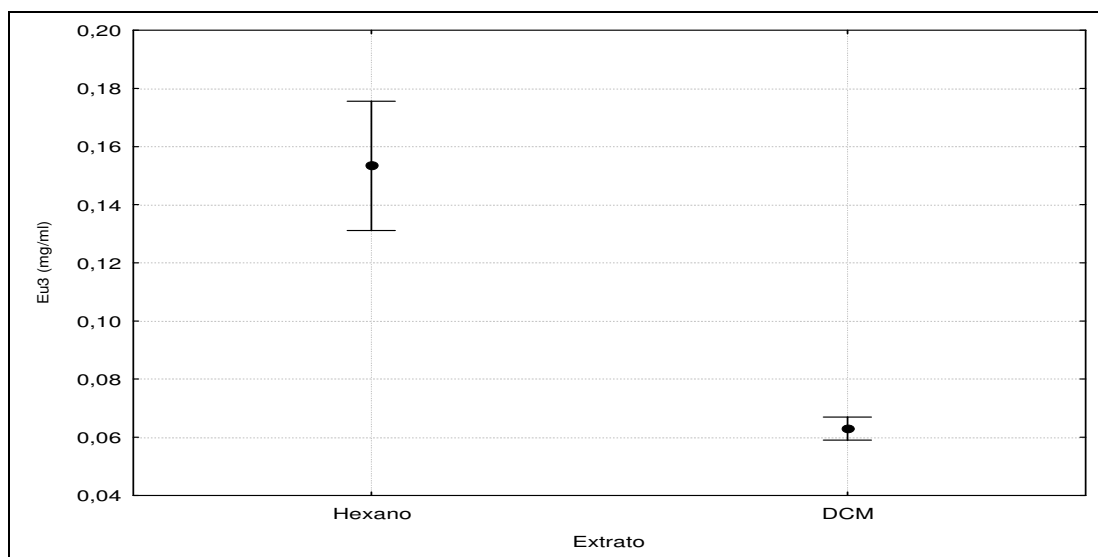


FIGURA 72 - Concentrações médias e intervalos de confiança (barras) de eupomatenóide-3 (mg/mL) para os diferentes tipos de extração

Quando foi analisada a concentração de eupomatenóide-3 nos diversos órgãos vegetais, verificou-se que esta neolignana apresentou um comportamento semelhante ao conocarpano (Figura 73), com as maiores concentrações presentes na raiz, seguida

das flores e folhas. A concentração média (0,11 a 0,16 mg/mL) obtida na raiz foi significativamente maior do que para folhas e flores (0,06 a 0,09 mg/mL).

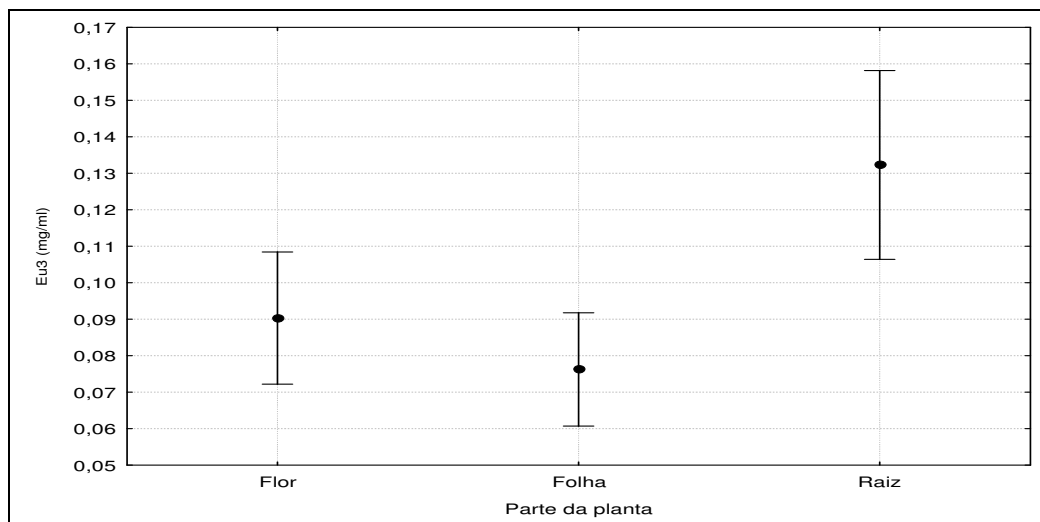


FIGURA 73 - Concentrações médias e intervalos de confiança (barras) de eupomatenóide-3 (Eu-3 em mg/mL) para as diferentes partes da planta.

As concentrações de eupomatenóide-3 (mg/mL) não variaram em relação às estações do ano, exceto o verão que apresentou menor concentração significativa em relação às demais épocas, inversamente ao ocorrido com o conocarpano. O eupomatenóide-3 apresentou desvios associados sempre maiores do que o conocarpano (Figura 74).

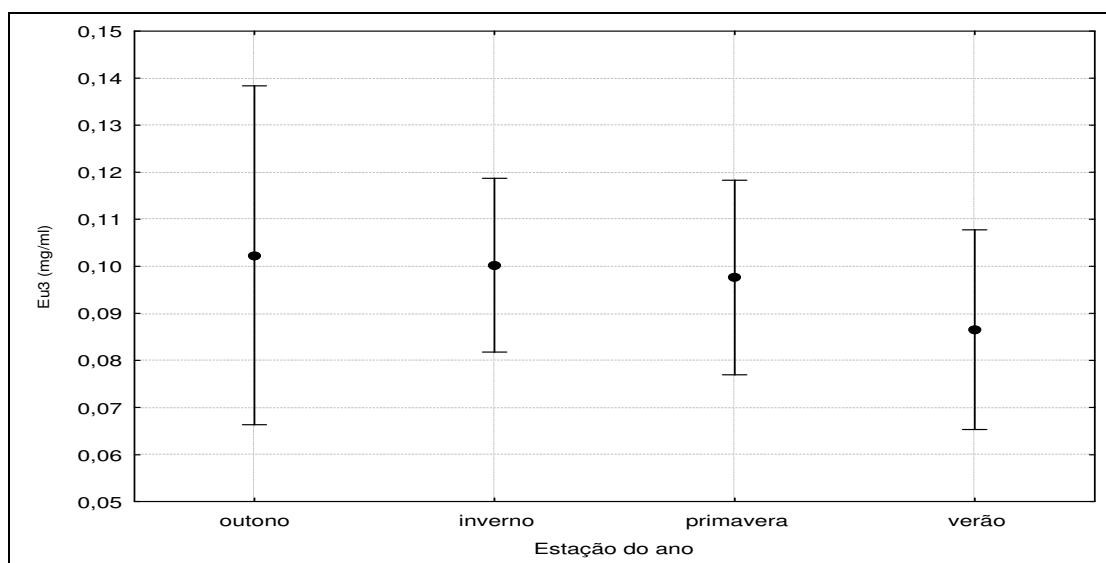


FIGURA 74 - Concentrações médias e intervalos de confiança (barras) da neolignana eupomatenóide-3 (em mg/mL) para as diferentes estações do ano.

Quando foi analisado o tipo de extração, os órgãos vegetais e as estações do ano (em relação à concentração de eupomatenóide-3 (mg/mL), verificou-se que este composto está mais concentrado no extrato hexânico das flores de outono, seguido das raízes de outono, inverno, verão e primavera. Como as raízes não devem ser coletadas, pelos motivos expostos anteriormente. Os extratos das folhas de inverno e das flores de verão apresentam uma redução de 40 % na concentração de eupomatenóide-3. De maneira semelhante ao conocarpano, o extrato em hexano das folhas de outono apresentou a menor concentração desta neolignana. Portanto, deve-se coletar as flores do outono quando se pretende isolar este composto. Os valores de intervalos de confiança são maiores porque nas análises cromatográficas os extratos de hexano apresentaram-se heterogêneos e estão demonstrados na figura 75.

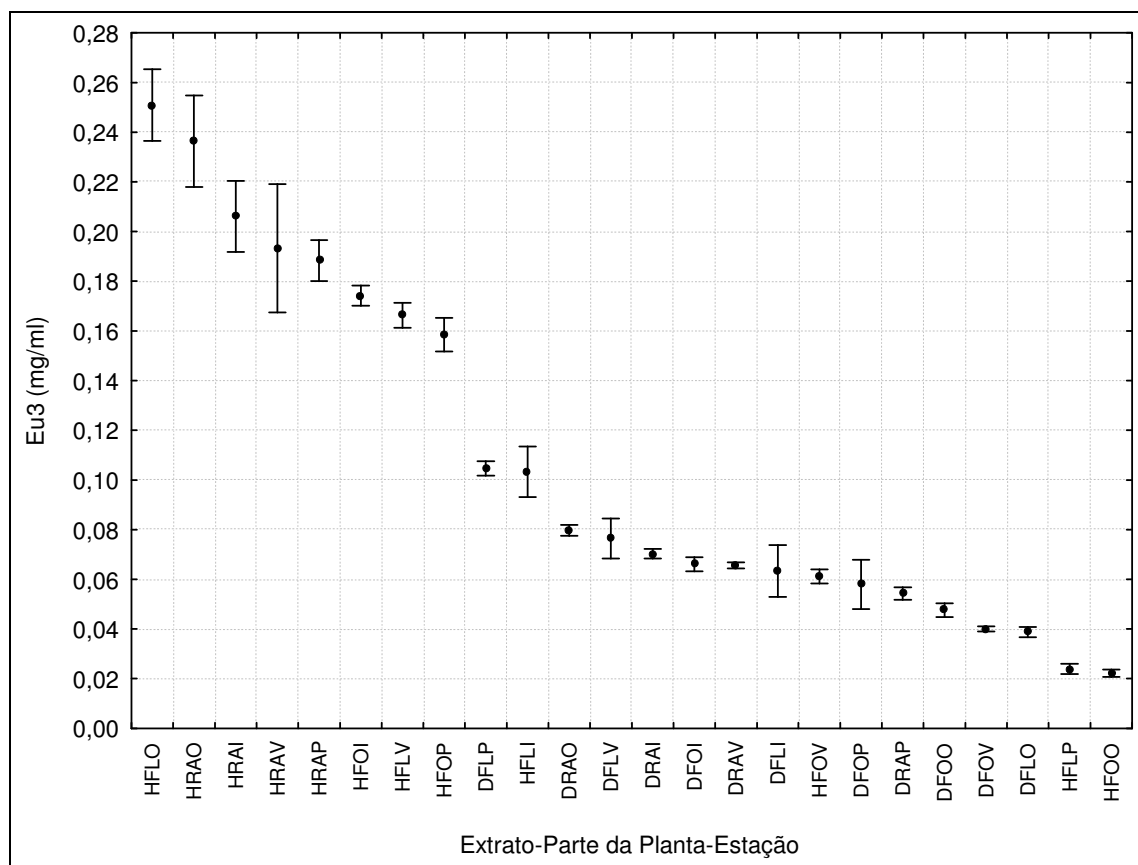




FIGURA 75 - Médias e desvios padrão associados à combinação dos extratos, partes da planta e estações do ano. NOTAS: o código utilizado mostra o tipo de extrato na primeira letra (D-DCM e H-Hexano), a parte da planta nas segundas e terceiras letras (RA-Raiz, FL-Flor e FO-Folha) e a estação do ano na quarta letra (O-Outono, I-Inverno, P-Primavera e V-Verão).

Quando os dados foram analisados considerando-se os rendimentos dos extratos de cada órgão da planta em cada estação do ano (calculou-se em mg de eupomatenóide-3/100g de parte de planta seca), o eupomatenóide-3 apresentou um comportamento semelhante ao do conocarpano em relação às partes da planta, com as maiores concentrações nas flores e raízes. Os melhores rendimentos foram associados aos extratos diclorometano das flores de verão e primavera, os quais estão relatados na Figura 76 e tabela 30.

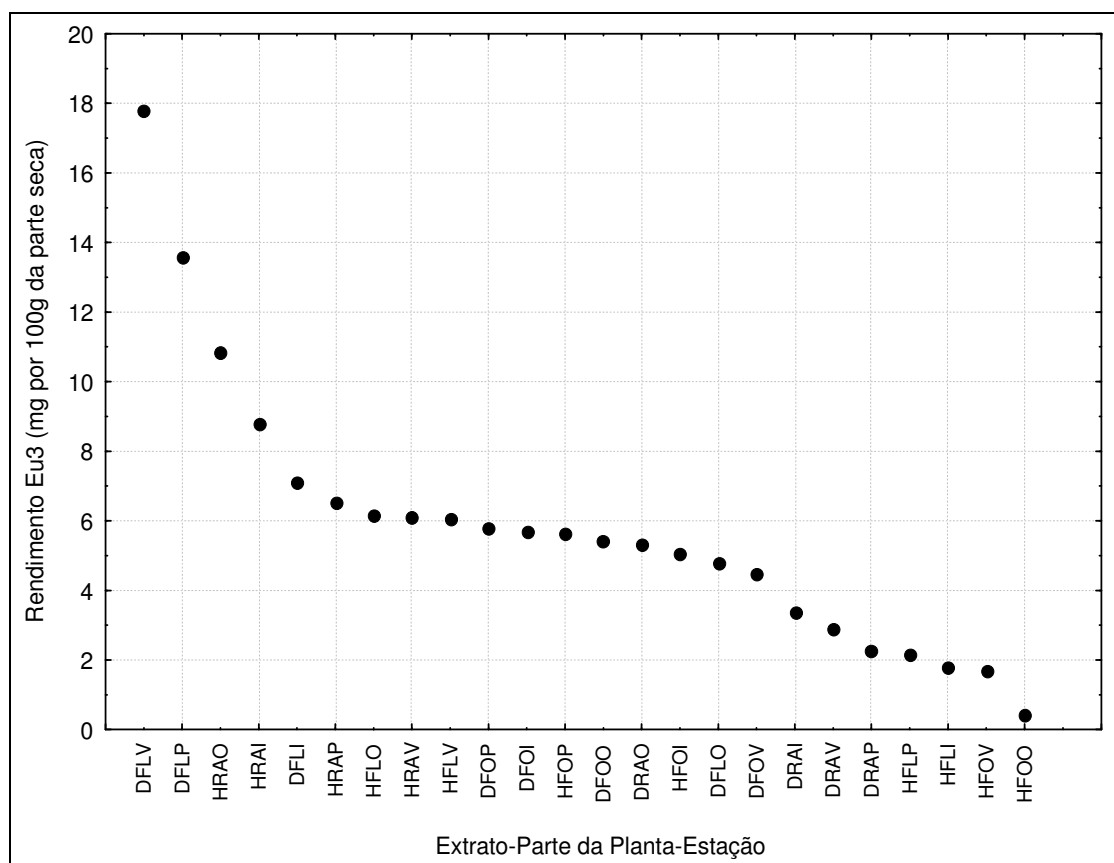


FIGURA 76 - Rendimento médio associado à combinação dos extratos, partes da planta e estações do ano. NOTAS: o código utilizado mostra o tipo de extrato na primeira letra (D-DCM e H-Hexano), a parte da planta nas segundas e terceiras letras (RA-Raiz, FL-Flor e FO-Folha) e a estação do ano na quarta letra (O-Outono, I-Inverno, P-Primavera e V-Verão).

#### 5.8.2.2 Eupomatenóide-5 como marcador químico

O eupomatenóide-5 apresentou diferenças significativas com relação a sua concentração somente para a parte da planta e a estação do ano. A Figura 77 mostra os valores médios e desvios para esta neolignana com relação ao tipo de extração. Não foi encontrada diferença entre as concentrações médias entre os solventes hexano e diclorometano como agente extrator.

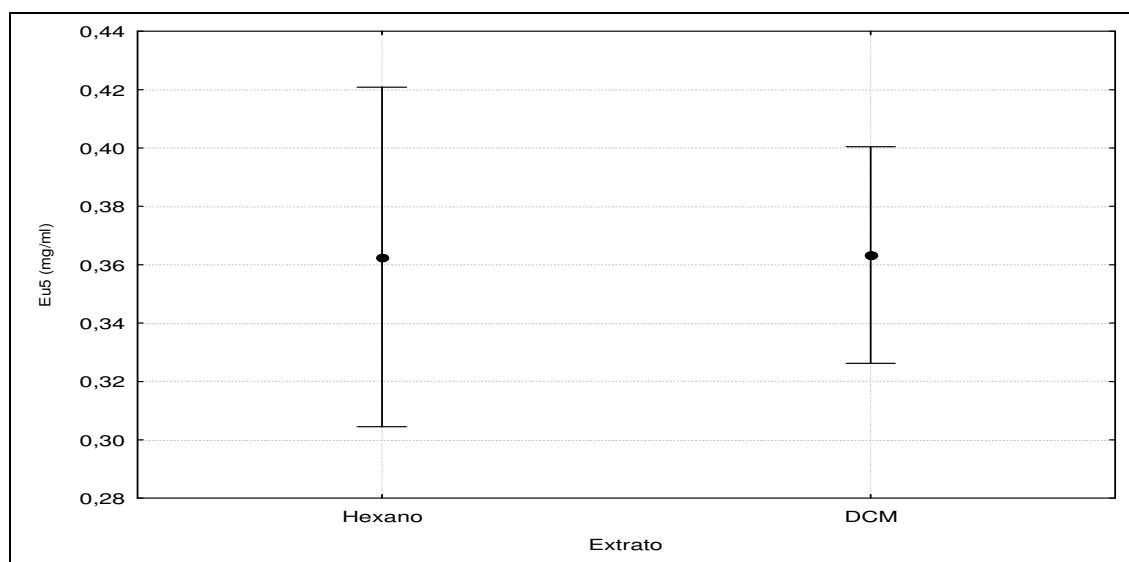


FIGURA 77 - Concentrações médias e intervalos de confiança (barras) de eupomatenóide-5 (em mg/mL) para os diferentes tipos de extração

Quando foi analisado o órgão vegetal com maior concentração de eupomatenóide-5 (mg/mL), verificou-se que este apresentou comportamento inverso

aos demais (Figura 78), com as maiores concentrações presentes nas folhas e as menores presentes na raiz, todas significativamente diferentes.

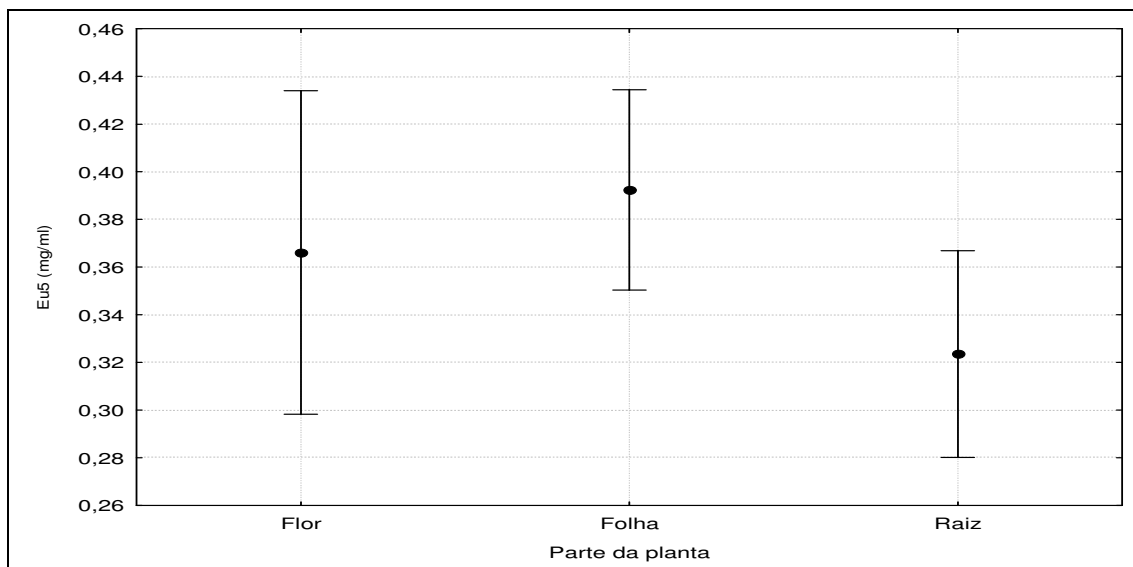


FIGURA 78- Concentrações médias e intervalos de confiança (barras) da neolignana eupomatenóide-5 (em mg/mL) para as diferentes partes da planta.

Em relação às estações do ano, o verão foi a única estação que apresentou concentração (mg/mL) significativamente diferente, sendo maior em relação às demais. O eupomatenóide -5 mostrou comportamento inversamente ao ocorrido com o eupomatenóide-3 e semelhante ao conocarpano para as estações do ano. Apenas a concentração média obtida no verão foi significativamente maior do que para as outras estações (Figura 79).

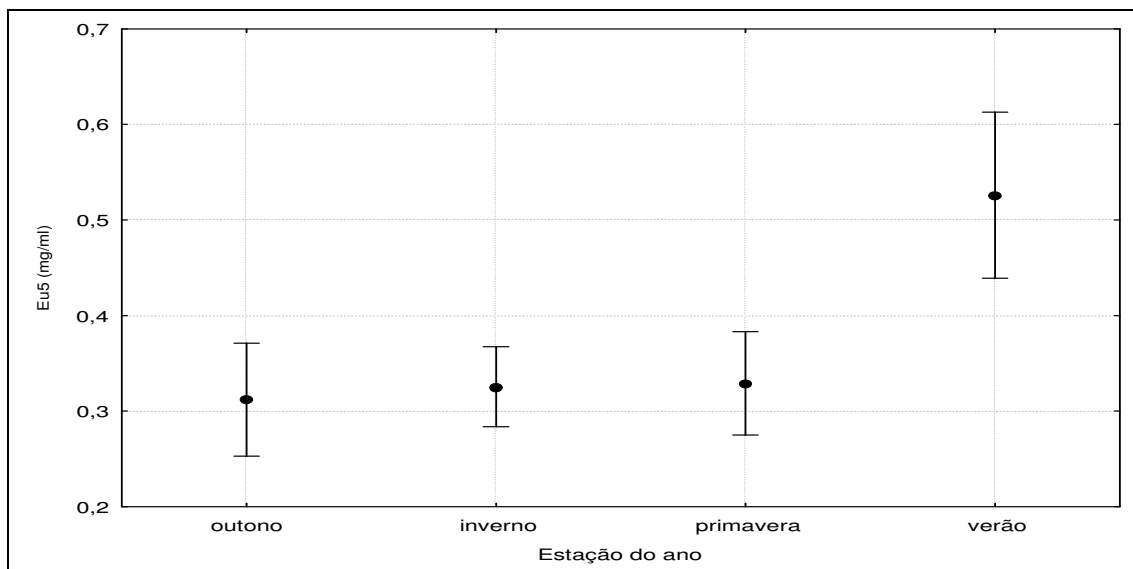


FIGURA 79 - Concentrações médias e intervalos de confiança (barras) do eupomatenóide-5 (em mg/mL ) para as diferentes estações do ano.

Quando cruzou-se os dados referentes ao tipo de extrato, órgão vegetal e a estação do ano (figura 80), verificou-se que o eupomatenóide-5 está presente em maior concentração (mg/mL) nas flores no período do verão, independente do tipo de extração, se o solvente utilizado foi o hexano ou o diclorometano, seguido das raízes de outono e folhas de verão. De maneira semelhante, ao conocarpano e eupomatenóide-3, o extrato em hexano das folhas de outono foi o que apresentou a menor concentração deste composto. Portanto, quando se deseja isolar o eupomatenóide-5 devemos coletar as flores do período do verão.

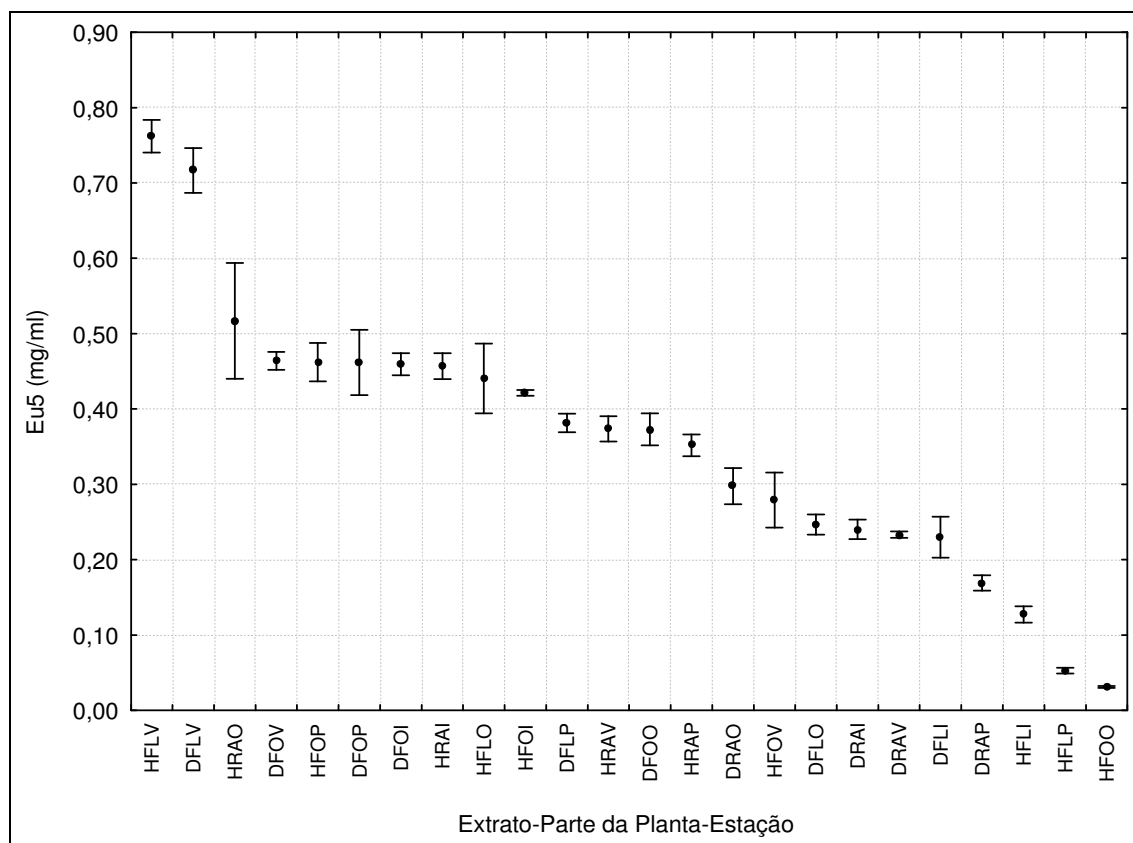


FIGURA 80 - Médias e desvios padrão associados à combinação dos extratos, partes da planta e estações do ano. NOTAS: o código utilizado mostra o tipo de extrato na primeira letra (D-DCM e H-Hexano), a parte da planta nas segundas e terceiras letras ( RA - Raiz, FL-Flor e FO - Folha ) e a estação do ano na quarta letra (O - Outono, I- Inverno, P- Primavera e V – Verão).

Quando foi analisado os rendimentos dos extratos dos diferentes órgãos vegetais nas 4 estações do ano observou-se que o extrato em diclorometano das flores no verão obteve um rendimento altíssimo em relação aos demais e que o extrato em hexano das folhas de outono ao contrário, obteve um rendimento mínimo, como está demonstrado na figura 81, os quais foram calculados em mg de eupomatenóide-5/100g da parte da planta seca.

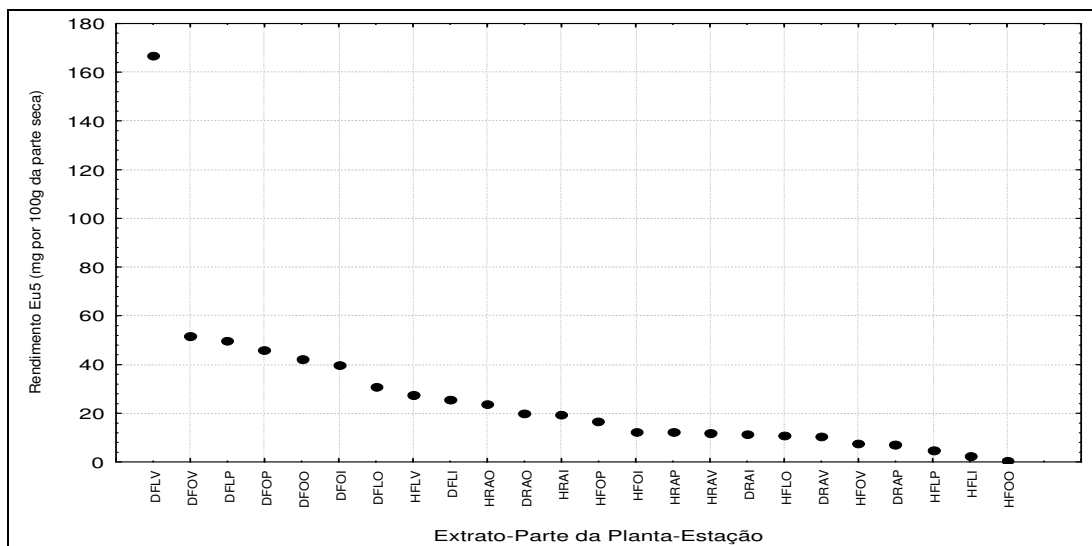


FIGURA 81 - Rendimento médio associado à combinação dos extratos, partes da planta e estações do ano. NOTAS: o código utilizado mostra o tipo de extrato na primeira letra (D - DCM e H - Hexano), a parte da planta nas segundas e terceiras letras (RA-Raiz, FL-Flor e FO-Folha) e a estação do ano na quarta letra (O-Outono, I - Inverno, P-Primavera e V-Verão).

Em virtude dos resultados obtidos na avaliação da atividade microbiológica realizada (**ver p.200**) com amostras do extrato bruto, frações e as neolignanas benzofurânicas: conocarpano, eupomatenóide-3 e eupomatenóide-5 isoladas das folhas de outono da espécie vegetal *P. solmsianum*, verificamos que o conocarpano demonstrou ser um potente antifúngico tendo ação contra algumas cepas de fungos dermatófitos. Portanto, o controle de qualidade químico visou principalmente à quantificação do conocarpano.

As análises comentadas acima indicaram a presença do conocarpano em todas as partes da planta e em todas as épocas do ano. Verificou-se também que o conocarpano está presente em maior concentração nas raízes e flores e que o verão é a melhor época de coleta da *Piper solmsianum* C.DC.var. *solmsianum*.

### 5.8.3 Análise do Extrato Acetato de Etila por CLAE

Foram analisadas por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) em fase reversa 16 amostras referentes as soluções dos extratos acetato de etila (AE) dos órgãos vegetais (raiz, caule, folha e flor) coletados nas 4 estações do ano (primavera, verão, outono e inverno) da espécie vegetal *Piper solmsianum* C.DC. var. *solmsianum*. As amostras foram eluídas no gradiente acetronitrila (A) - água acidificada pH 3,5 (B) com ácido orto fosfórico 0,05%, nas proporções de 15:85 (v:v) e 85:15 (v:v). Os flavonóides orientina (**56**), hesperidina (**57**) e genkwanina (**58**) foram detectados por espectro de UV nos comprimentos de onda 256,6; 267,9 e 284,5 nm nos seguintes tempos de retenções:  $17,0 \pm 1,5$  min,  $39,0 \pm 0,5$  min e  $50,0 \pm 1$  min respectivamente. As concentrações dos marcadores químicos 56, 57 e 58 foram determinadas a partir de suas curvas de calibrações, as quais foram plotadas baseadas nas análises de regressão linear das áreas dos picos versus as concentrações injetadas em CLAE<sup>147,148</sup>. Os resultados estão demonstrados na tabela 32 e figura 82. Na tabela 33 foram demonstradas as equações de regressão linear e seus coeficientes de correlações (r).

TABELA 32 – Concentração (mg/mL) de orientina, hesperidina e genkwanina nos diversos órgãos vegetais nas diferentes épocas do ano

ÓRGÃO	ÉPOCA DO ANO	ORIENTINA (mg/mL)	DESVIO PADRÃO	HESPERIDINA (mg/mL)	DESVIO PADRÃO	GENKWANINA (mg/mL)	DESVIO PADRÃO
Flor	Outono	-	-	0,0037	0,000675	0,0970	0,013455
Flor	Inverno	-	-	0,0030	0,000000	0,1730	0,014491
Flor	Primavera	-	-	-	-	0,1325	0,024972
Flor	Verão	-	-	0,0030	0,000000	0,2700	0,006245
Folha	Outono	0,0760	0,010033	0,0035	0,000577	0,0685	0,002082
Folha	Inverno	0,0333	0,002517	0,0210	0,00100	0,1456	0,019035
Folha	Primavera	0,0673	0,001155	0,0363	0,000577	0,1460	0,005000
Folha	Verão	0,0140	0,001000	0,0086	0,000577	0,1466	0,007234
Raiz	Outono	-	-	-	-	0,1280	0,002000
Raiz	Inverno	-	-	-	-	0,0736	0,003215
Raiz	Primavera	-	-	-	-	0,0633	0,001528
Raiz	Verão	-	-	-	-	0,1160	0,002646
Caule	Outono	-	-	-	-	0,0820	0,001000
Caule	Inverno	-	-	-	-	0,0168	0,000764
Caule	Primavera	-	-	-	-	0,0330	0,001000
Caule	Verão	-	-	-	-	0,0167	0,000608

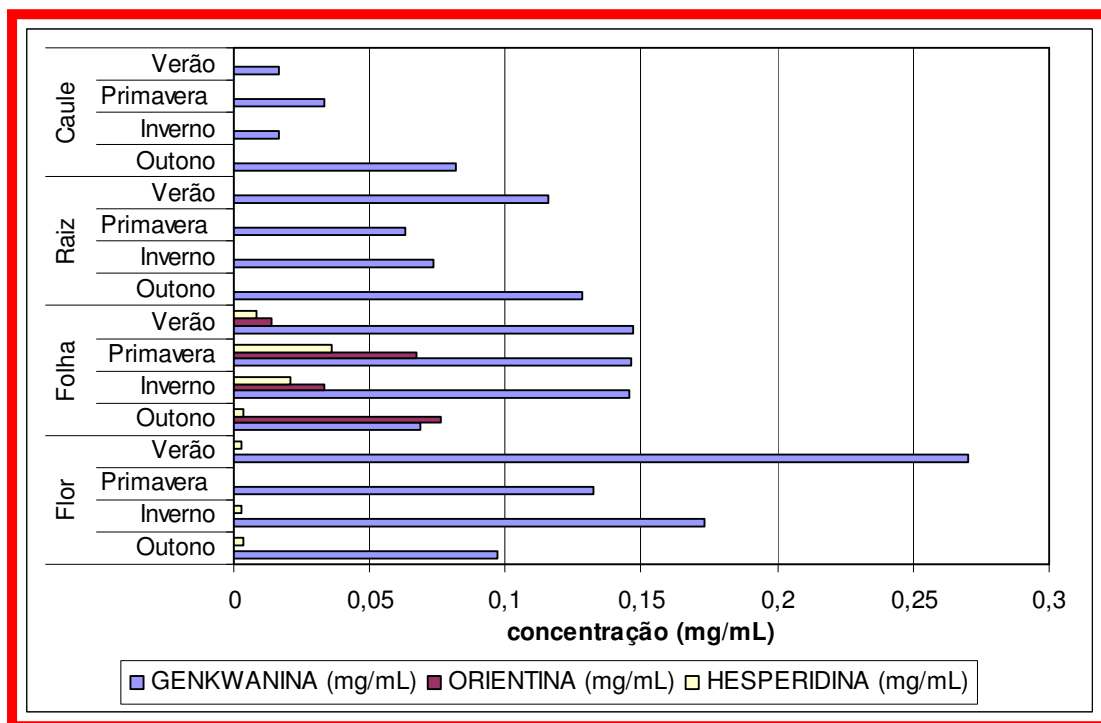


FIGURA 82 - Concentração (mg/mL) de orientina, hesperidina e genkwanina nos diversos órgãos vegetais da *P. solmsianum* C.DC. nas diferentes épocas do ano.

TABELA 33 – Equações de regressão de linear e seus coeficientes de correlações (r)

	<i>EQUAÇÃO DE REGRESSÃO</i>	MARCADOR QUÍMICO
Orientina	$Y = 1,68e + 007 X + 5,52e + 004$	$r = 0,994120$
Hesperidina	$Y = 1,92e + 007X$	$r = 0,997658$
<b>Genkwanina</b>	$Y = 4,18e + 007 X + 8,00e + 005$	$r = 0,976602$

O cromatograma da folha da primavera foi selecionado para ser demonstrado na figura 83, por apresentar um perfil cromatográfico contendo os três marcadores químicos mencionados acima. Os picos foram identificados por comparação dos tempos de retenção e espectros no ultravioleta UV (figura 84) com padrões autênticos dos flavonóides orientina (256,6 nm), hesperidina (284,5 nm) e genkwanina (267,9 nm).



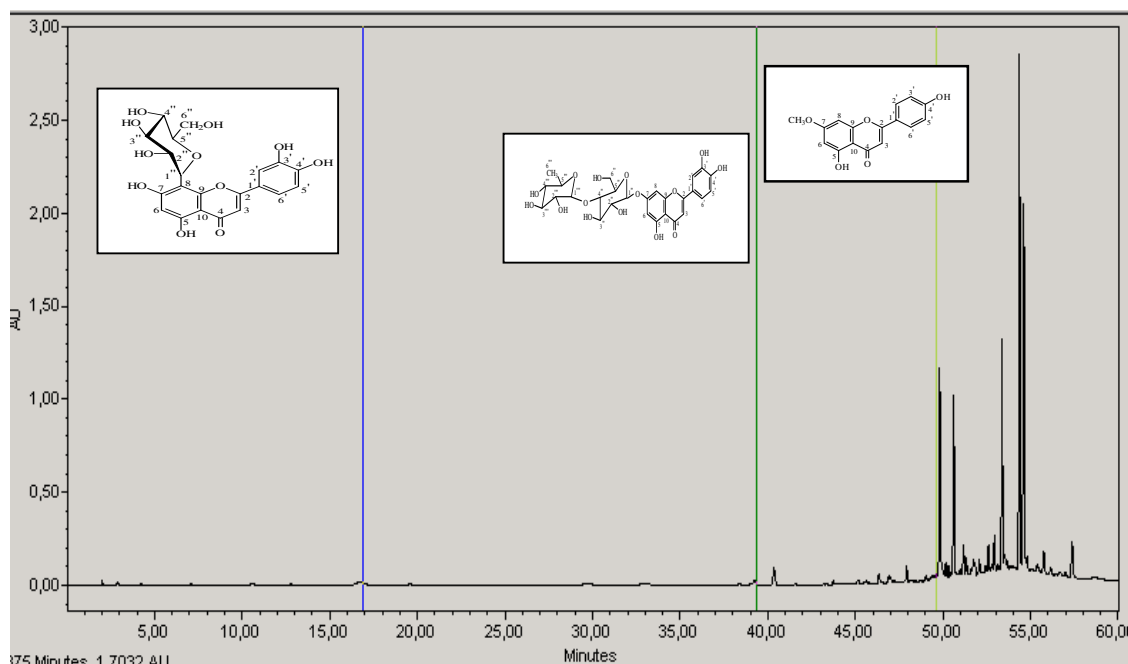


FIGURA 83 - Cromatograma CLAE do extrato AE das folhas de primavera de *P. solmsianum* demonstrando os tempos de retenções para a orientina, hesperidina e genkwanina

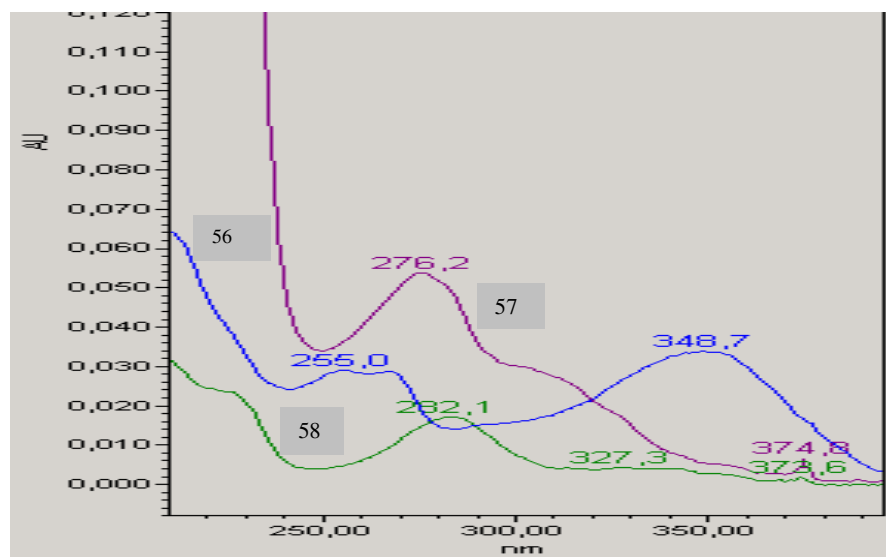


FIGURA 84 - Espectro no ultravioleta indicando os comprimentos de onda em nm dos marcadores químicos orientina (56), hesperidina (57) e genkwanina (58) identificados no extrato AE das folhas de primavera de *P. solmsianum*.

Nas figuras 85, 86 e 87 abaixo estão demonstrados os espectros de ultravioleta e os cromatogramas em CLAE dos padrões dos marcadores químicos sazonais: orientina, hesperidina e genkwanina, os quais nos indicam o melhor comprimento de onda (nm) em nanômetros para leitura e o tempo que estes compostos ficaram retidos na coluna.

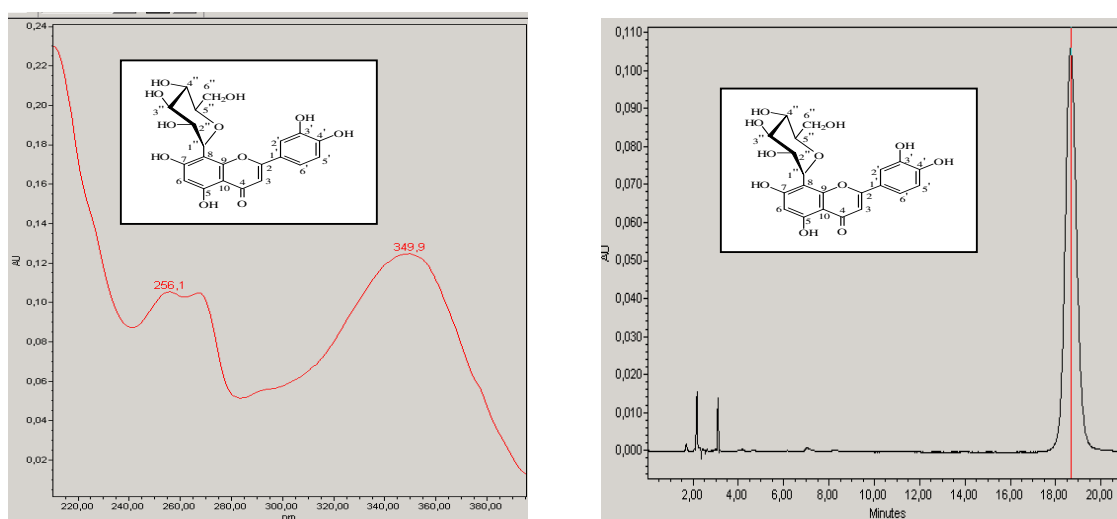


FIGURA 85 - Espectro no UV (256,6 nm) e cromatograma do padrão da orientina (17  $\pm$  1,5 min)

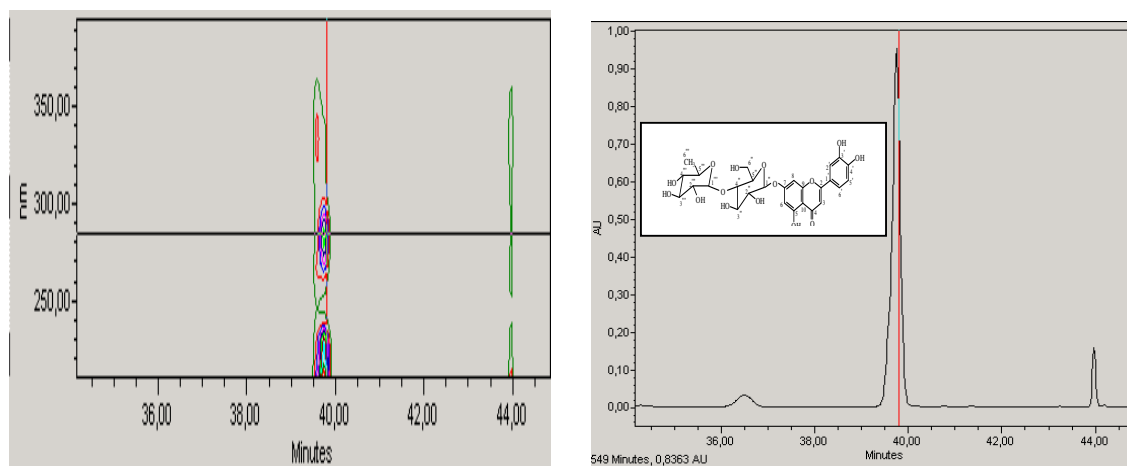


FIGURA 86 - Espectro no UV (284,5 nm) e cromatograma do padrão da hesperidina (39  $\pm$  0,5 min)

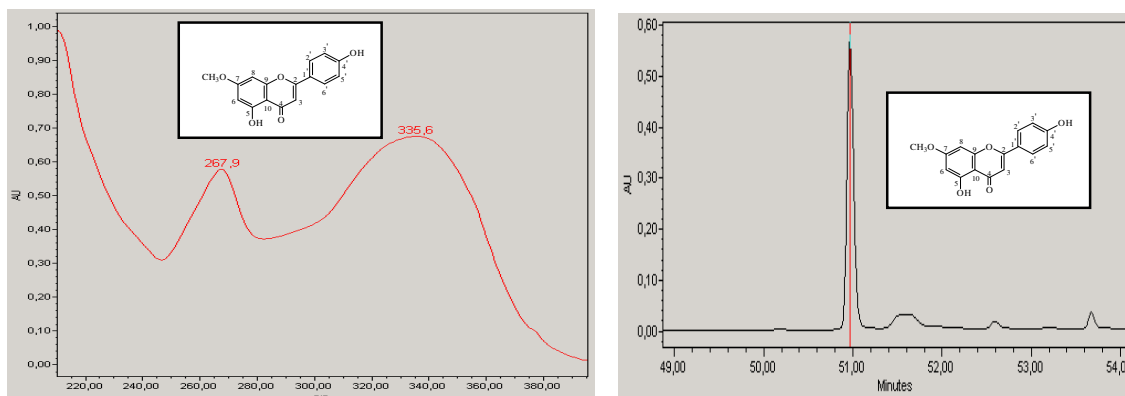


FIGURA 87 - Espectro no UV (267,9nm) e cromatograma do padrão da genkwanina (50,97 min)

Analizando-se os dados obtidos com relação ao estudo sazonal do extrato acetato de etila da *Piper solmsianum* C.DC. var. *solmsianum* com relação a presença dos marcadores químicos e a interação entre o órgão vegetal e a época do ano, verificou-se que a orientina está presente somente nas folhas e estatisticamente a concentração no outono e na primavera são iguais, seguida do inverno e no verão onde foi detectado apenas traços. A hesperidina aparece traços nas folhas na primavera. A flavona 7-metoxi - apigenina (genkwanina) está presente em todas as partes das plantas, mas a maior concentração está na flor de verão (figuras 88). A flor é um órgão vegetal com função de reprodução e os flavonóides se constituem em um pigmento amarelo com função de atração de insetos para propiciar a polinização<sup>86, 149, 150, 151</sup>. A 7-metoxi-apigenina é uma flavona que atrai principalmente as abelhas para a produção de mel e própolis, guiadas pela presença de absorção do VIS pelas flavonas, presentes na flor<sup>150, 152</sup>.

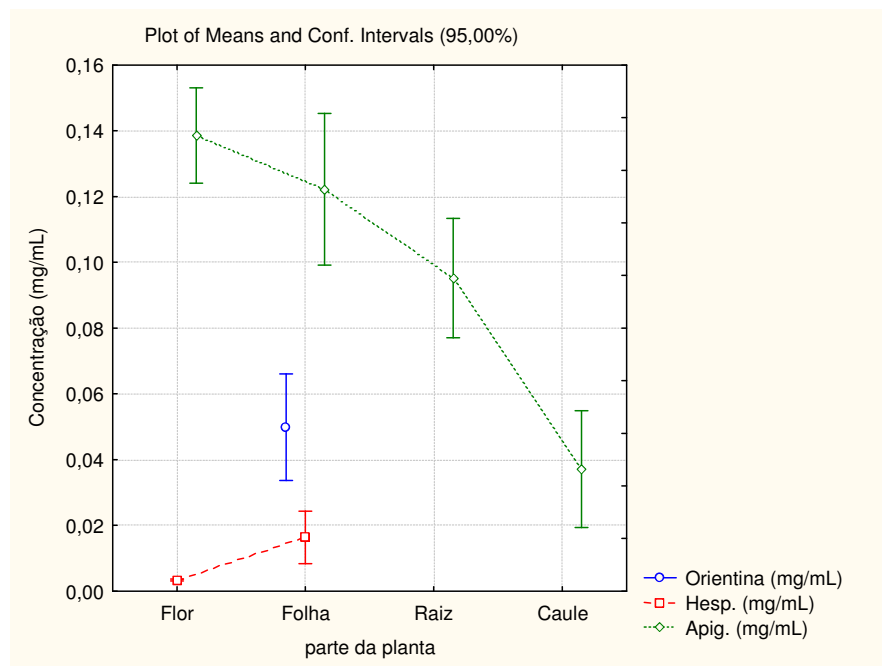


FIGURA 88 - Gráfico da concentração dos marcadores químicos (mg/mL) X órgão vegetal

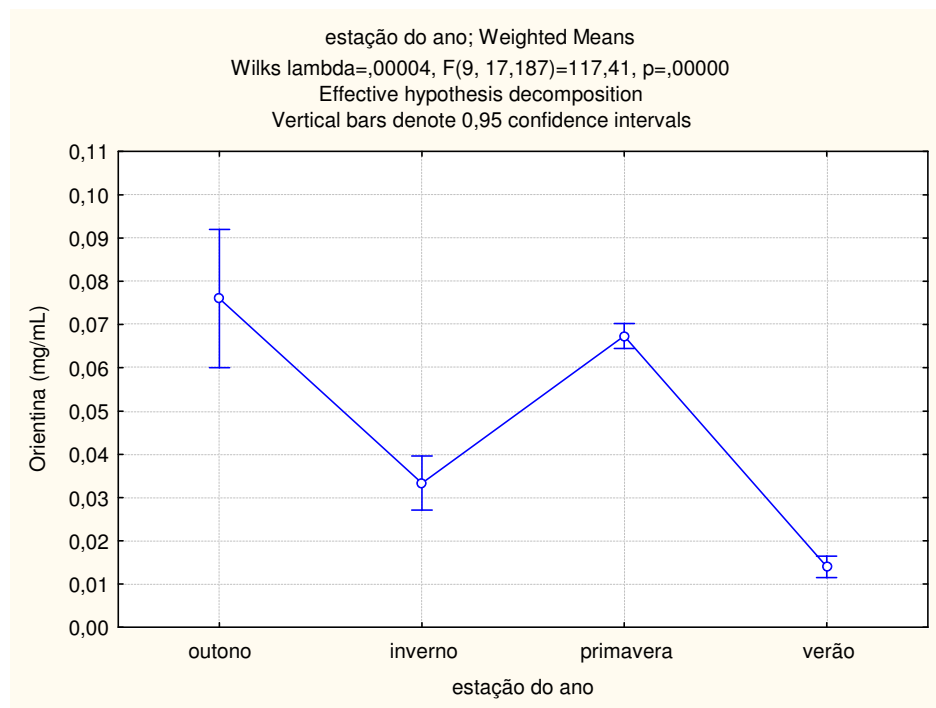


FIGURA 89 - Concentração de orientina nas folhas (mg/mL) X estações do ano

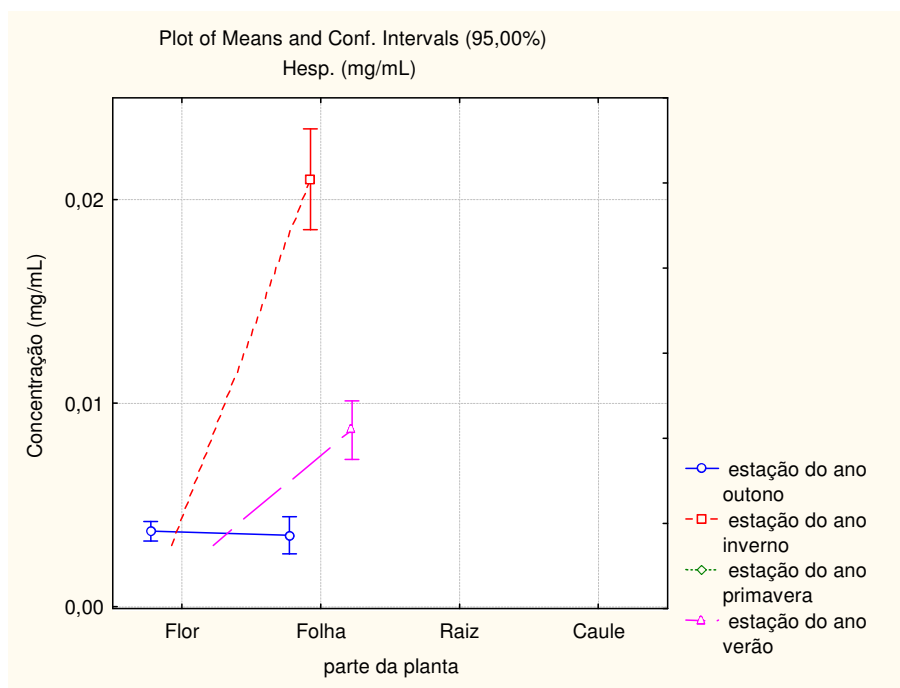


FIGURA 90 - Concentração de hesperidina (mg/mL) nos vários órgãos vegetais X época do ano

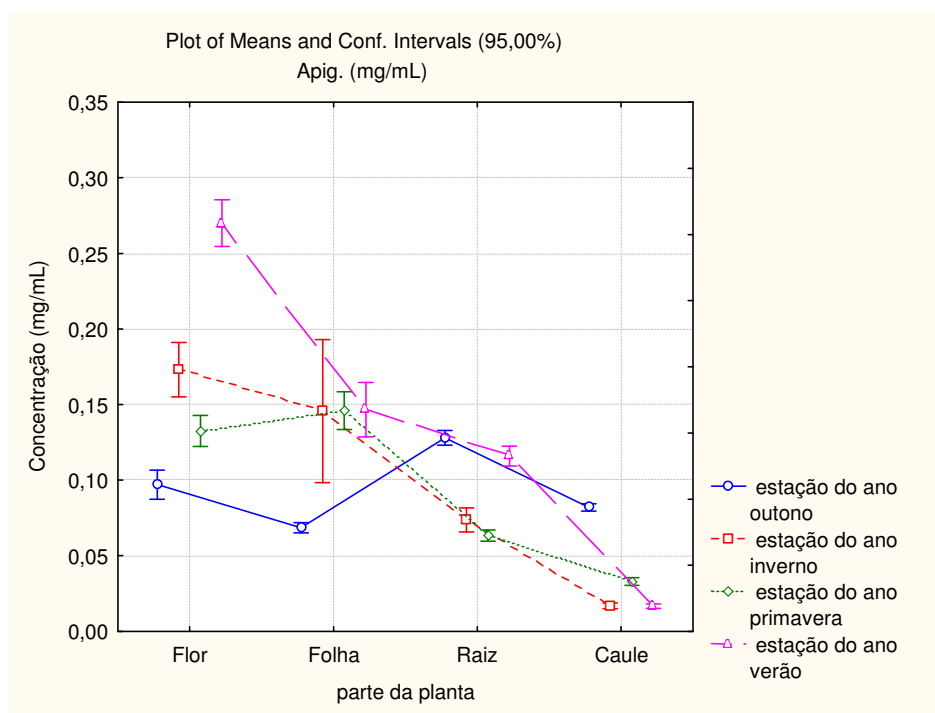


FIGURA 91 - Concentração de genkwanina nos vários órgãos vegetais X época do ano

O estudo do controle de qualidade sazonal nos permitiu constatar a variabilidade da composição química da espécie vegetal *P. solmsianum* C.DC. var. *solmsianum* nos seus diversos órgãos vegetais e nas diferentes épocas do ano. Este fato se deve as interações que o vegetal realiza com o meio ambiente. Fatores como: habitat, época e horário de coleta, fertilidade, tipo do solo, umidade, radiação solar, vento, temperatura, período vegetativo, período de crescimento, dentre outros, influenciam e alteram a composição química dos vegetais<sup>136</sup>. O grande problema que ocorre em virtude destas transformações quantitativas dos fitoconstituintes é que se refletem de forma determinante nas atividades biológicas esperadas da planta.

Portanto, o controle de qualidade sazonal é uma estratégia importantíssima dentro da área de produtos naturais, uma vez que direciona a melhor época do ano para a coleta e seu beneficiamento. Inúmeros trabalhos são relatados na literatura, mostrando que, através deste tipo de análise é possível traçar um perfil químico dos metabólitos secundários da planta, como se fosse sua impressão digital e dessa forma, otimizar e oportunizar melhor o aproveitamento do seu potencial terapêutico<sup>95</sup>.

Neste contexto, o presente estudo oportunizou o desenvolvimento de uma metodologia analítica a qual propiciou a otimização de métodos analíticos para a obtenção das melhores condições para a preparação dos seus extratos, bem como a seleção do órgão vegetal e estação do ano para o isolamento das neolignanas conocarpano, eupomatenóide-3, eupomatenóide -5, as flavonas orientina e genkwanina e a flavanona hesperidina, dados estes que estão demonstradas na tabela 34.

TABELA 34 – Valores de concentração (mg/mL), solvente de extração, época do ano e órgão vegetal para conocarpano, eupomatenóide-3, eupomatenóide-5, orientina, Genkwanina e hesperidina

COMPOSTO	CONCENTRAÇÃO (mg/mL)	SOLVENTE	PERÍODO	ÓRGÃOS VEGETAIS
Conocarpano	1,779	DCM	Outono	Raiz
	1,505		Verão	Flor
Eupomatenóide-3	0,250	HEX	Outono	Flor
Eupomatenóide-5	0,780	HEX	Verão	Flor
	0,730	DCM	Verão	Flor
Orientina	0,076	AE	Outono	Folha
	0,067		Primavera	Folha
Genkwanina	0,270	AE	Verão	Flor
<b>Hesperidina</b>	0,036	AE	Primavera	Folha

## 5.9 RESULTADOS DOS TESTES FARMACOLÓGICOS E BIOLÓGICOS

No Brasil, as plantas medicinais da flora nativa são consumidas com pouca ou nenhuma comprovação de suas propriedades farmacológicas, propagandas por usuários ou comerciantes<sup>153</sup>.

### 5.9.1 Atividade Analgésica

A atividade analgésica foi avaliada através de estímulos químicos induzidos pelo ácido acético e pela formalina em camundongos.

#### 5.9.1.1 Efeito antinociceptivo no modelo das contorções abdominais induzidas pela injeção intraplantar de ácido acético

Os resultados apresentados na figura 92 referem-se ao tratamento dos camundongos pela via intraperitoneal com as frações hexano, diclorometano e acetato de etila obtidas da *Piper solmsianum* C.DC. var. *solmsianum*, na dose de 10 mg/Kg. Após 30 minutos de administração verificou-se que a fração hexânica foi inativa e que as frações acetato de etila e diclorometano foram ativas, pois causaram uma significativa ( $P < 0,01$ , Dunnett) redução do número das contorções abdominais. A inibição máxima (IM) da fração acetato de etila foi de 83,88 % enquanto que a da fração diclorometano foi de 56,04 % em relação ao grupo controle C para este modelo de dor. Portanto, neste modelo de dor a fração acetato de etila foi mais ativa do que a diclorometano. Estes resultados nos sugerem que o potente efeito analgésico da fração acetato de etila se deva a flavona orientina, seu composto majoritário e ao conocarpano, o principal constituinte químico da fração diclorometano obtidas das folhas do outono da *Piper solmsianum*.

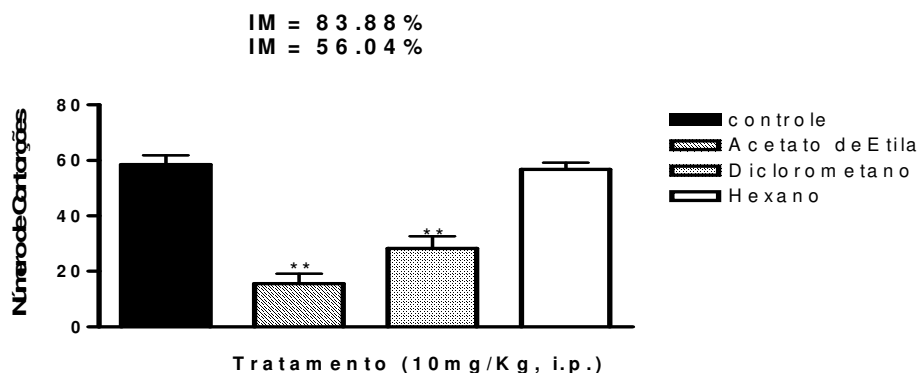


FIGURA 92 - Efeito analgésico das frações de *P. solmsianum* C.DC. pela via intraperitoneal. As colunas e barras verticais representam a média s.e.m.\*\* P<0,01 – indicativo de significância.

Os resultados apresentados na figura 93 mostram que a flavona orientina isolada da fração acetato de etila da *Piper solmsianum* C.DC.var. *solmsianum* administrada pela via intraperitoneal (3, 6 e 10 mg/Kg) causou inibição significativa ( $P < 0,01$ , Dunnett) sendo dose-dependente nas contorções abdominais induzidas pela injeção de ácido acético (0,6 %) em camundongos. O valor da  $DI_{50}$  foi de 6,48 (4,82 – 22,4) mg/Kg e IM de 66,18 % em relação ao grupo controle C. Estes dados confirmam a análise acima exposta<sup>150</sup>.

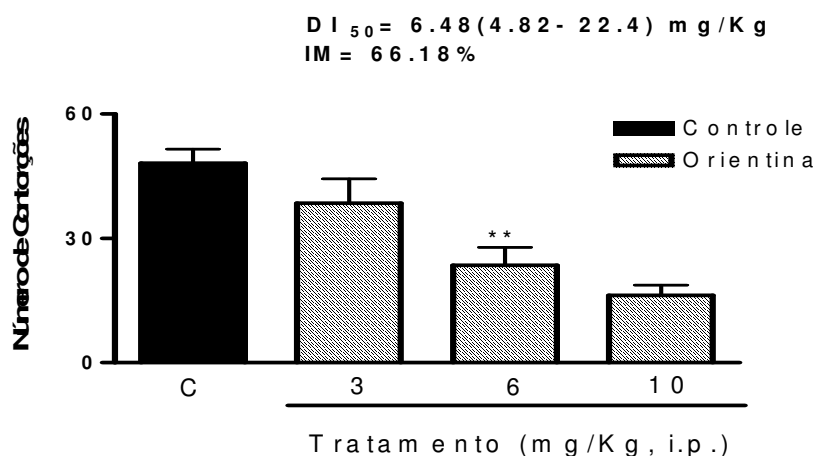


FIGURA 93 - Efeito antinociceptivo da orientina pela via sistêmica, em relação às contorções abdominais induzidas pela injeção do ácido acético (0,6 %) em camundongos em relação ao controle. As colunas e barras verticais representam a média  $\pm$  e.p.m.\*\* P<0,01 – indicativo de significância.



Os resultados apresentados na Figura 94 demonstraram que a flavona orientina administrada pela via oral (100, 300 e 500) mg/Kg causou inibição de forma significativa ( $P < 0,01$ , Dunnett) dose-dependente no teste das contorções abdominais induzidas pela injeção de ácido acético (0,6 %) em camundongos. A orientina causou um efeito dose dependente ( $DI_{50}$ ) de 197,19 (200 - 258,45) mg/Kg e IM de 63,32 %, em relação ao grupo controle C.

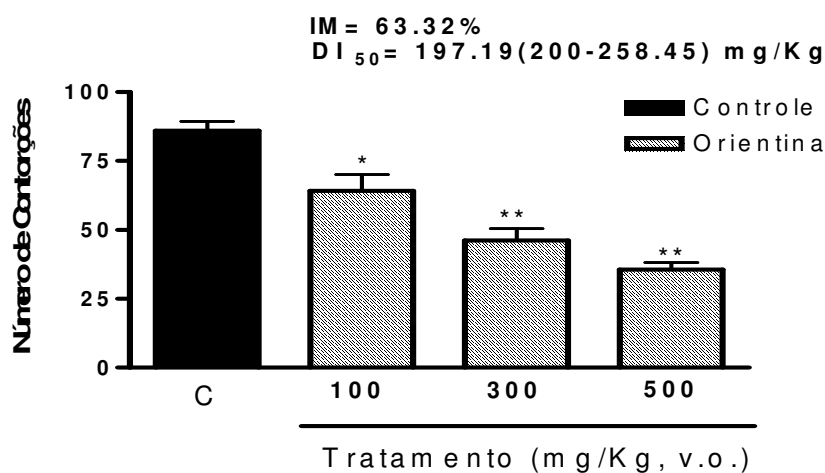


FIGURA 94 - Efeito antinociceptivo causado pela orientina administrada pela via oral em relação às contorções abdominais causada pela injeção de ácido acético (0,6 %) em camundongos. As colunas e barras verticais representam a média  $\pm$  e.p.m. \*  $P < 0,05$ , \*\*  $P < 0,01$ .

Os resultados demonstrados na figura 95 (A) mostram que a orientina administrada pela via intraperitoneal (3, 6 e 10 mg/Kg) causou inibição significativa ( $P < 0,01$ , Dunnett) dose-dependente das contorções abdominais induzidas pela injeção intraplantar de ácido acético (0,6 %) em camundongos. O valor médio da  $DI_{50}$  foi de 6,48 (4,82 – 22,4) mg/Kg e IM de 70,26 % em relação ao grupo controle C. O efeito antinociceptivo da orientina foi significativo no tempo de 30 minutos até 4 horas após a sua administração pela via intraperitoneal (figura 95 B).

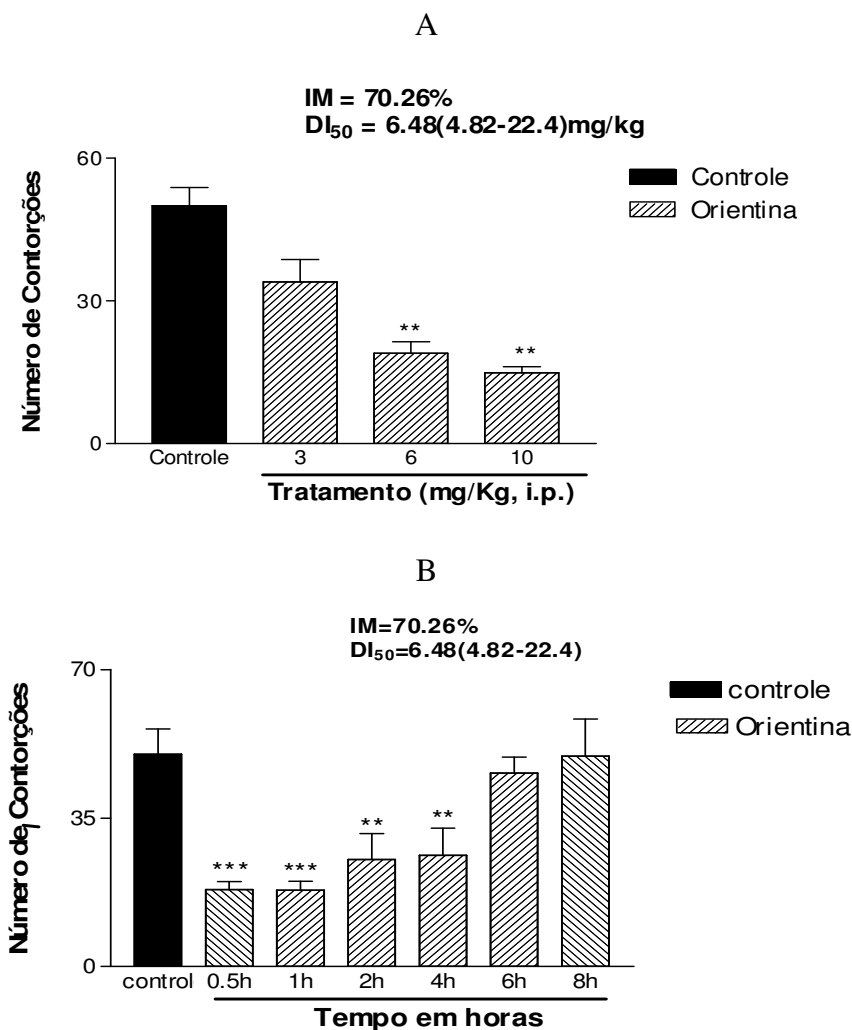


FIGURA 95 A e B - Efeito antinociceptivo tempo-dependente causado pela orientina administrada pela via intraperitoneal em relação às contorções abdominais causadas pela injeção de ácido acético em camundongos. As colunas e barras verticais representam a média  $\pm$  e.p.m. \*\*  $P < 0,01$ , \*\*\*  $P < 0,001$  – indicativo de significância.

Os resultados apresentados na figura 96 nos demonstram que a administração do conocarpano pela via intraperitoneal no teste das contorções abdominais induzidas pelo ácido acético nas concentrações de (10, 30 e 60) mg/Kg em camundongos, promoveu um efeito analgésico significativo ( $P < 0,01$ , Dunnett) dose-dependente. A

DI<sub>50</sub> foi de 22,4 (17,4 – 32,46) mg/Kg e IM de 57,37 % em relação ao grupo controle C.

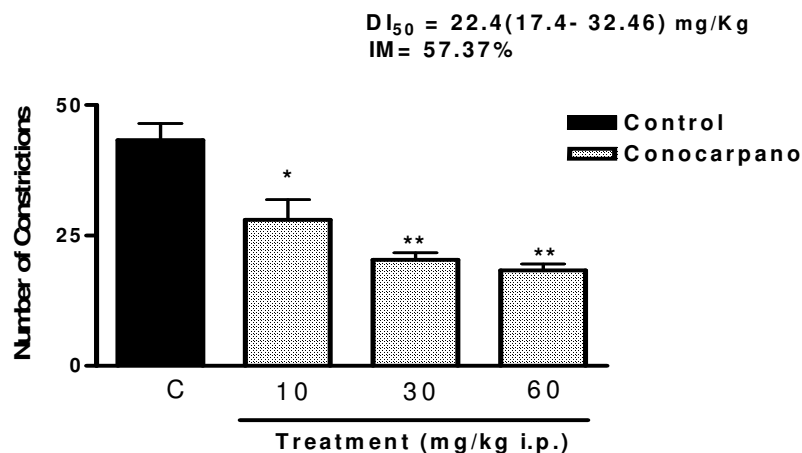


FIGURA 96 - Efeito antinociceptivo causado pelo conocarpano administrado pela via intraperitoneal em relação às contorções abdominais causada pela injeção de ácido acético (0,6 %) em camundongos. As colunas e barras verticais representam a média  $\pm$  e.p.m. \*  $P < 0,05$ , \*\*  $P < 0,01$ .

Os resultados apresentados na figura 97 referem-se ao tratamento dos camundongos pela via intraperitoneal com os derivados do conocarpano na dose de 10 mg/Kg. Após 30 minutos de administração verificou-se que o conocarpano benzoilado foi inativo enquanto que o conocarpano acetilado e metilado foram ativos. O conocarpano acetilado foi mais ativo que o conocarpano metilado, pois causou uma redução do número das contorções abdominais induzidas pelo ácido acético mais significativa ( $P < 0,01$ , Dunnett) do que o conocarpano metilado ( $P < 0,05$ , Dunnett) em relação ao grupo controle C.

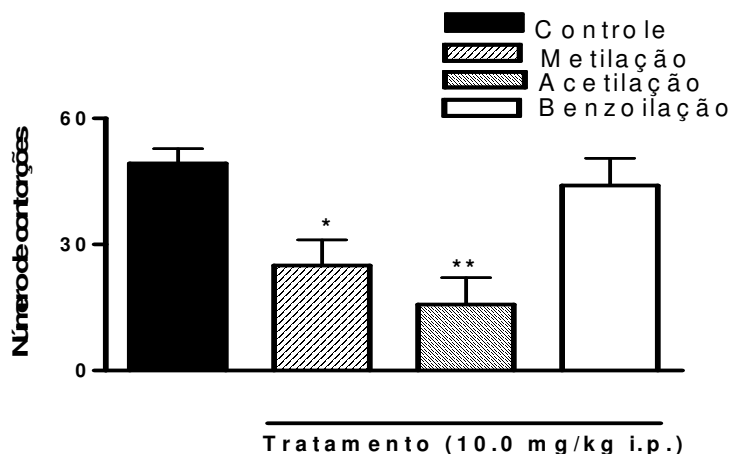


FIGURA 97 - Efeito antinociceptivo causado pelos derivados do conocarpano administrado pela via intraperitoneal em relação às contrações abdominais causada pela injeção de ácido acético (0,6 %) em camundongos. As colunas e barras verticais representam a média  $\pm$  e.p.m. \*  $P < 0,05$ , \*\*  $P < 0,01$ .

Comparando-se o efeito antinociceptivo do conocarpano em relação aos seus derivados metilado, acetilado e benzilado no modelo experimental das contrações abdominais induzidas pelo ácido acético pela administração pela via intraperitoneal (figura 98) na dose de 10 mg/Kg em camundongos, os resultados obtidos demonstram que o conocarpano benzilado foi inativo enquanto que o conocarpano acetilado e metilado apresentaram uma atividade significativa. Estabelecendo-se um parâmetro comparativo entre o conocarpano e seus derivados, verifica-se que o derivado acetilado foi mais ativo que o conocarpano e o conocarpano metilado, pois permitiu uma redução do número das contrações abdominais de forma mais significativa ( $P < 0,01$ , Dunnett), IM de 68,32 % que o conocarpano metilado ( $P < 0,05$ , Dunnett) IM 48,23 % e o conocarpano 43,14 % em relação ao grupo controle C.

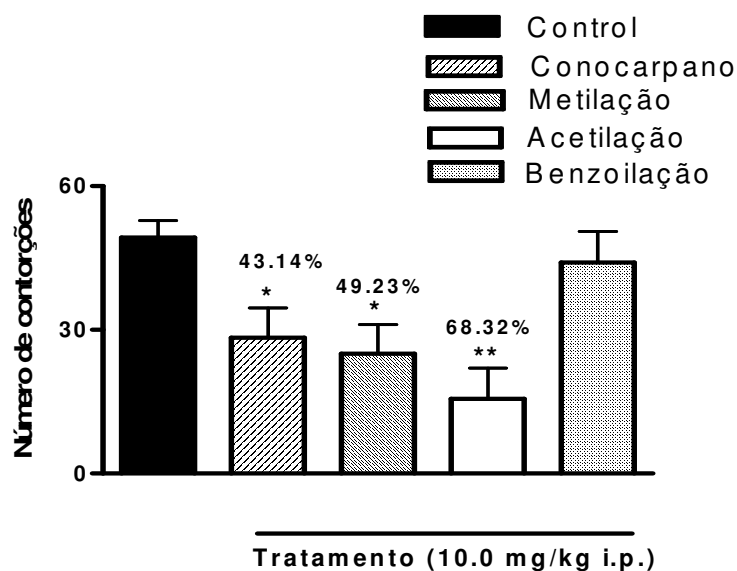


FIGURA 98 - Efeito antinociceptivo causado pelo conocarpano e seus derivados administrado pela via intraperitoneal em relação às contrações abdominais causada pela injeção de ácido acético (0,6 %) em camundongos. NOTAS: as colunas e barras verticais representam a média  $\pm$  e.p.m. \*  $P < 0,05$ , \*\*  $P < 0,01$ .

A atividade analgésica dos análogos ao conocarpano (figura 99) foi avaliada através de estímulos químicos induzidos pelo ácido acético. Os resultados apresentados na figura 96 demonstram que a administração do  $\alpha$ -di-isoeugenol pela via intraperitoneal nas concentrações de 10, 15 e 30 mg/Kg em camundongos, promoveu um efeito analgésico significativo ( $P < 0,01$ , Dunnett) dependente da dose no teste das contrações abdominais induzidas pelo ácido acético. A  $DI_{50}$  foi de 17,4 (14,35 – 29,44) mg/Kg e inibição máxima de 78,85 % na dose de 30 mg/Kg em relação ao controle C.

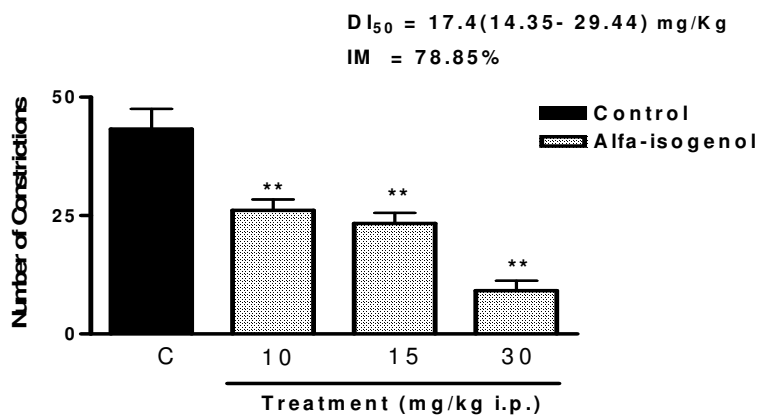


FIGURA 99 - Efeito antinociceptivo causado pelo  $\alpha$  - di isoeugenol administrado pela via intraperitoneal em relação às contorções abdominais causada pela injeção de ácido acético (0,6 %) em camundongos. As colunas e barras verticais representam a média  $\pm$  e.p.m. \*  $P < 0,05$ , \*\*  $P < 0,01$ .

O diidrodiisoeugenol (figura 100) quando administrado pela via intraperitoneal na dose de (10, 15 e 30) mg/Kg de camundongos reduziu de forma significativa ( $P < 0,01$ , Dunnett) o número de contorções abdominais induzidas pelo ácido acético de forma dose-dependente ( $DI_{50}$ ) 18,27 (6,0 – 28,4) mg/Kg e IM de 83,08 % em relação ao grupo controle C.

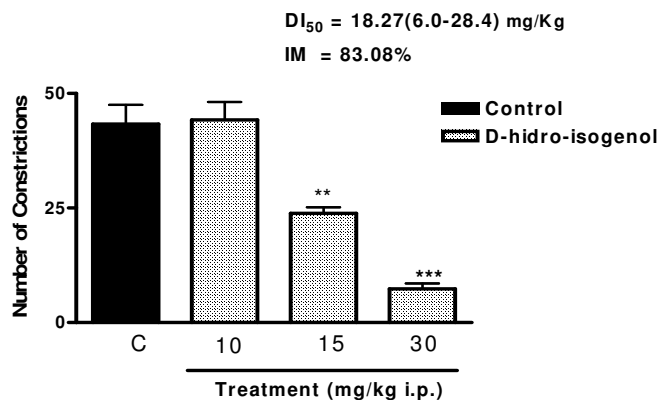


FIGURA 100 - Efeito antinociceptivo causado pelo diidrodiisoeugenol administrado pela via intraperitoneal em relação às contorções abdominais causada pela injeção de ácido acético (0,6 %) em camundongos. As colunas e barras verticais representam a média  $\pm$  e.p.m. \*  $P < 0,05$ , \*\*  $P < 0,01$ .

As contorções abdominais induzidas pelo ácido acético representam um modelo de nocicepção periférica, o qual consiste de estímulos de alta intensidade e a resposta nociceptiva é de curta duração, este não é um modelo específico, uma vez que diferentes classes de substâncias também inibem contorções. São elas: os hipotensores, depressores e estimulantes do sistema nervoso central (SNC), anti-histamínicos e antidepressivos tricíclicos. Mas em contrapartida é um modelo relativamente simples, de fácil observação e rápido. Além disso, os resultados obtidos com as várias classes de fármacos analgésicos neste modelo mostram boa correlação com a ação analgésica encontrada em outros modelos pré-clínicos. Portanto, a interpretação da redução da dor através do estímulo pelo ácido acético, deve ser efetuada de forma cautelosa em conjugação com outros testes<sup>154, 155</sup>.

#### 5.9.1.2 Efeito antinociceptivo no modelo das contorções abdominais induzidas pela injeção intraplantar de formalina

A figura 101 (A e B) refere-se ao modelo da dor induzida pela formalina por administração pela via intraperitoneal das frações hexânica, diclorometano e acetato de etila na dose 10 mg/Kg em camundongos. Observa-se que as frações acetato de etila e diclorometano causaram inibição significativa ( $P < 0,01$ , Dunnett) em ambas as fases da dor induzida pela formalina (2,5 %, 20  $\mu$ L/pata) e que a fração hexânica apresentou inibição significativa ( $P < 0,05$ , Dunnett) apenas na segunda fase desse modelo. Na primeira fase (dor de origem neurogênica) (figura 101 A), a inibição média (IM) das frações acetato de etila e diclorometano foram de 55,07 % e 63,76 % em relação ao grupo controle C. Portanto, a fração acetato de etila demonstrou ser mais efetiva que a fração diclorometano na primeira fase deste modelo. Na segunda fase (dor inflamatória) (figura 101 B), IM das frações diclorometano, acetato de etila e hexano foram de 38,49%, 52,00% e 76,20% respectivamente. Portanto, a fração diclorometano foi mais efetiva na redução do edema produzido pela formalina do que as demais frações em relação ao grupo controle C na segunda fase deste modelo de dor.

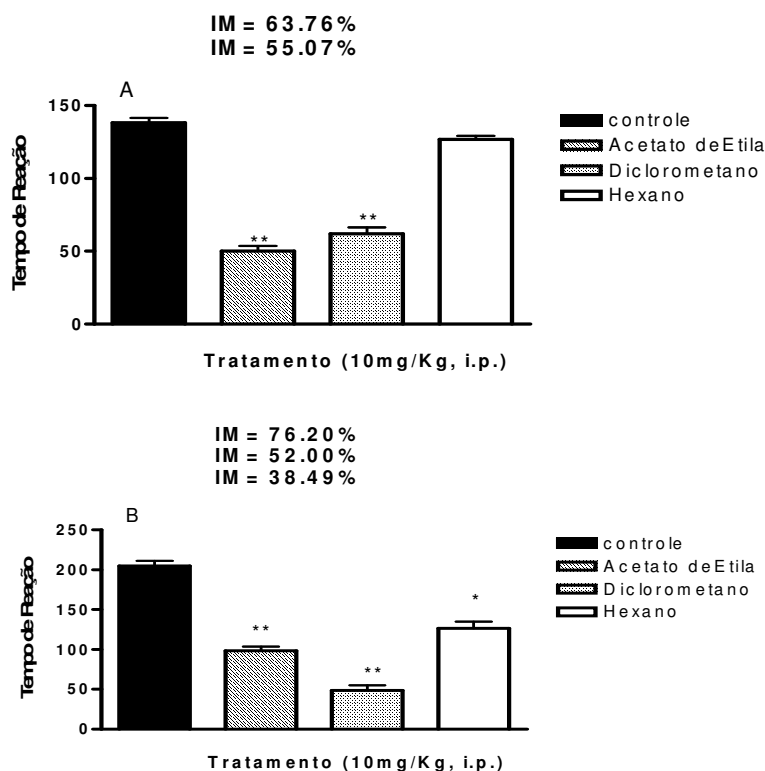


FIGURA 101 A e B - Efeito antinociceptivo causado pelas frações hexano, diclorometano e acetato de etila da *P. solmsianum* C.DC pela via intraperitoneal da dor induzida pela formalina (2,5 %). As colunas e barras verticais representam a média  $\pm$  e.p.m.\*  $P < 0,05$ , \*\*  $P < 0,001$  – indicativo de significância.

Dessa forma, os resultados obtidos no teste da formalina realmente reforçam a hipótese de que esta planta medicinal é dotada de importante atividade antinociceptiva e/ ou antiinflamatória.

Os resultados apresentados na figura 102 (A) nos permitiram observar que a orientina não foi ativa em relação ao grupo controle C na primeira fase (dor de origem neurogênica), quando administrada pela via intraperitoneal na dose de 10, 30, 60 mg/Kg em camundongos. Na segunda fase do teste, figura 102 (B), a orientina apresentou uma inibição dose-dependência ( $DI_{50}$ ) para concentrações maiores que 60 mg/Kg com IM de 53,49 %.



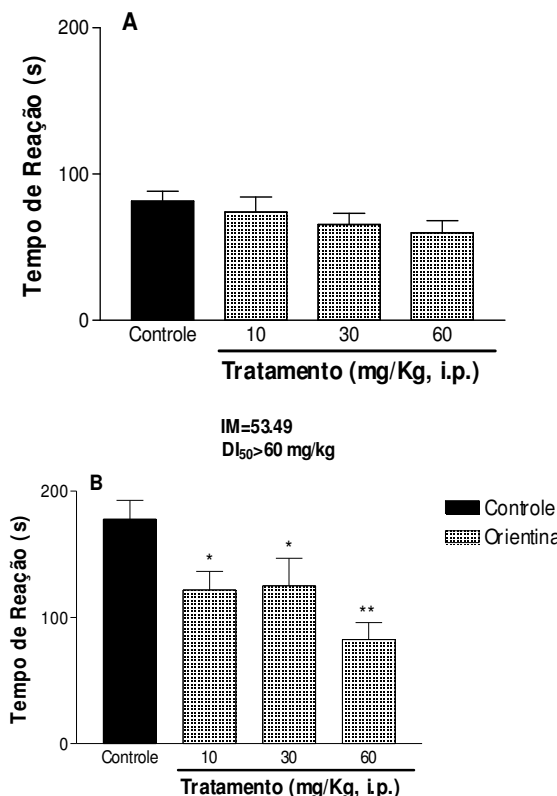


FIGURA 102 A e B - Efeito antinociceptivo dose-dependente causado pela orientina isolada da fração AE da *Piper solmsianum* C.DC. pela via intraperitoneal da dor induzida pela formalina (2,5%)

O teste da formalina é mais específico e muito mais usado para o estudo de nocicepção. A injeção de formalina produz resposta bifásica distinta: a primeira fase representa o efeito irritante da formalina nas fibras sensoriais do tipo C que caracteriza a dor neurogênica e a segunda fase é a dor inflamatória. Os analgésicos de ação central como a morfina, inibem as duas fases, enquanto que drogas de ação periférica, como os antiinflamatórios e corticóides inibem somente a segunda dose. Esta técnica é útil para detectar analgésicos do tipo aspirina além de ser capaz de dissociar dor do tipo inflamatório e não inflamatório. Além disso, permite avaliar em animais a dor contínua de intensidade moderada causada pela lesão do tecido e o papel dos sistemas endógenos na regulação da dor<sup>154,155,156</sup>.

Os resultados obtidos com a orientina indicam que o efeito antinociceptivo seria através de mecanismos semelhantes àqueles descritos para outras substâncias analgésicas/ antiinflamatórias como a aspirina e indometacina onde os efeitos analgésicos são descritos por inibição da síntese de prostaglandinas e diminuição da sensibilidade de receptores nociceptivos periféricos<sup>154,156</sup>.

Quando comparamos a  $DI_{50}$  da flavona com a  $DI_{50}$  dos analgésicos comerciais: a aspirina® que é de 25 mg/Kg e a do tylenol® que é de 23 mg/Kg, pode-se concluir que a orientina apresentou um efeito analgésico bem mais potente, quando administrado pela via intraperitoneal do que os fármacos em questão, amplamente utilizados na clínica<sup>154</sup>.

A análise conjunta dos resultados obtidos com as frações hexânica, diclorometano e acetato de etila, compostos isolados, derivados do conocarpano e seus análogos isolados da *Piper solmsianum* C.DC. var. *solmsianum*, nos modelos da nocicepção induzida pelo ácido acético e formalina indicam que esta planta e seus constituintes apresentam potencial terapêutico para o desenvolvimento de fármacos analgésicos, tanto ao que se refere controle de nocicepção de origem neurogênica como inflamatória. Pretende-se verificar o mecanismo de ação da orientina a nível de sistema nervoso central. Este trabalho está sendo realizado pela UFSC e o NIQFAR (Núcleo de Investigação Químico-Farmacêutico) – Universidade do Vale do Itajaí- Itajaí- SC pela Professora Márcia Souza.

Os resultados obtidos para atividade antinociceptiva da *Piper solmsianum* C.DC. var. *solmsianum* ainda não foram relatados na literatura, são portanto, inéditos.

### 5.9.2 Atividade Antimicrobiana – CIM

A presente atividade antimicrobiana foi realizada pela aluna de mestrado Marina Pereira de Campos sob orientação do Professor Dr. Alexandre Bella Cruz em Ciências Farmacêuticas pertencente ao Núcleo de Investigação Químico –

Farmacêutico do NIQFAR (Núcleo de Investigação Químico-Farmacêutico) – Universidade do Vale do Itajaí- Itajaí- SC pelo Prof. Dr. Alexandre Bella Cruz.

### 5.9.2.1 Atividade antifúngica

O extrato metanólico bruto, frações e compostos puros obtidos das folhas de outono da *P. solmsianum* C.DC. var. *solmsianum* foram testados pelo método da concentração inibitória mínima (CIM) contra diversos fungos patogênicos oportunistas. As concentrações inibitórias mínimas do extrato bruto metanólico e frações hexano, diclorometano e acetato de etila com valores iguais ou inferiores a 1000 µg/mL e com valores iguais ou inferiores 250 µg/mL para as neolignanas eupomatenóide-3, eupomatenóide-5, conocarpano e a flavona orientina foram consideradas ativas. Os resultados estão demonstrados na tabela 35 abaixo.

TABELA 35 – Atividade antifúngica do extrato, frações e compostos da *P. solmsianum* C.DC. contra fungos filamentosos e expressas em concentração inibitória mínima<sup>162</sup>

AM	MIC (µg/mL)											
	FUNGOS FILAMENTOSOS									LEVEDURA		
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
EMB	>1000	>1000	>1000	900	20	20	20	60	20	700	800	>1000
HEX	>1000	>1000	>1000	1000	40	100	60	80	20	600	900	>1000
DCM	>1000	>1000	>1000	900	5	20	7	30	7	400	800	>1000
AE	>1000	>1000	>1000	1000	40	500	500	500	300	700	>1000	>1000
E-3	>1000	>1000	>1000	900	≤300	>1000	800	200	500	1000	>1000	>1000
E-5	>1000	>1000	>1000	900	6	8	7	5	5	70	>1000	>1000
CON	500	800	900	900	3	6	5	4	≤1	60	30	30
ORIE	>1000	>1000	>1000	>1000	7	9	8	8	9	90	>1000	>1000
CET	8	7	4	15	8	6	8	3	-	5	0,3	3

NOTAS: amostras(AM): extrato metanólico bruto (EMB), fração hexano (HEX), fração diclorometano (DCM), fração acetato de etila (AE), eupomatenóide-3 (E-3), eupomatenóide-5 (E-5), conocarpano (CON), orientina (ORIE), cetozonazol (CET), *Aspergillus flavus* (1), *Aspergillus fumigatus* (2), *Aspergillus niger* (3), *Rhizopus sp* (4), *Microsporum canis* (5), *Microsporum gypseum* (6), *Trychophyton mentagorphytes* (7), *Trychophyton rubrum* (8), *Epidermophyton floccosum* (9), *Cryptococcus neoformans* (10), *Candida albicans* (11), *Candida tropicalis* (12).

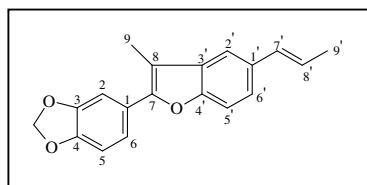
Os resultados demonstram que o extrato metanólico bruto (EMB) exibiu pronunciada atividade antifúngica contra todas as cepas dos fungos dermatófitos testadas, com valores CIM de 20 µg/mL *M. canis*, *M. gypseum*, *T. mentagrophytes* e *E. floccosum*, e 60 µg/mL para *T. rubrum*. Entretanto, todas as frações apresentaram interessante atividade contra dermatófitos, a fração DCM demonstrou uma atividade muito maior em relação as demais, com valores de CIMs entre 5 a 30 µg/mL similar ao fármaco cetoconazol. A atividade antifúngica da fração DCM deve-se ao seu principal constituinte químico, o conocarpano. No entanto, o extrato metanólico bruto (EMB) e todas as frações não exibiram efeito contra *hyphomycetos* hialinos do gênero *Aspergillus* e foram discretamente ativos contra o zigomycetos *Rhizopus sp* e as leveduras *C. albicans* e *C. neoformans*<sup>161</sup>.

Os compostos eupomatenóide-5, conocarpano e orientina exibiram pronunciada atividade contra todos os fungos dermatófitos testados, CIM igual ou inferior a  $\leq 9$  µg/mL, com potencia tão alta quanto o fármaco antifúngico padrão (cetoconazol) como pode ser observado na tabela 35. Além disso, estes compostos demonstraram boa atividade contra *C. neoformans* e o conocarpano foi ativo também contra *C. albicans* e *C. tropicalis*. Em contrapartida, o eupomatenóide-3 foi o composto que registrou menor atividade antifúngica contra todos os tipos de microorganismos testados<sup>161</sup>. Salientamos que este estudo é o primeiro a demonstrar a atividade antifúngica para a flavona orientina, portanto este dado é inédito.

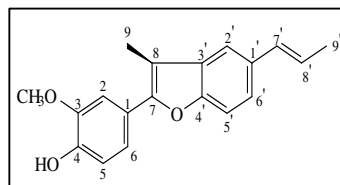
FREIXAS, *et. al.* (2001)<sup>67</sup> demonstraram que o eupomatenóide-6 e o conocarpano exibiram considerável atividade contra alguns fungos dermatófitos e leveduras. Eles sugeriram que a ausência do grupo metoxil na posição 3 da estrutura fenil-propenil-benzofurano e a saturação dos carbonos 7 e 8 poderiam exercer importante papel na atividade antimicrobiana<sup>67</sup>.

PESSINI, *et. al.* (2005)<sup>82</sup> avaliaram o potencial antifúngico do extrato e as neolignanas isoladas da *Piper regnellii* (Miq.) C.DC. e atribuíram que a atividade antifúngica do conocarpano poderia estar relacionada com a presença da hidroxila fenólica e a ausência da dupla ligação entre os carbonos 7 e 8<sup>82</sup>. Analisando-se os resultados de concentrações inibitórias mínimas obtidas na presente pesquisa e

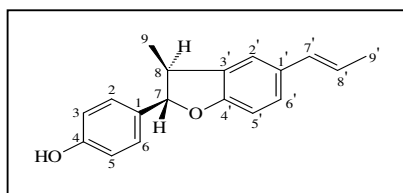
relacionando-se com as estruturas químicas do eupomatenóide-3 (**24**), eupomatenóide-5 (**16**), conocarpano (**15**) e orientina (**56**) acredita-se que a presença do grupo hidroxil na posição 4 da estrutura fenil-propenil-benzofurano também pode ser um dado importante para a atividade antimicrobiana<sup>161</sup>.



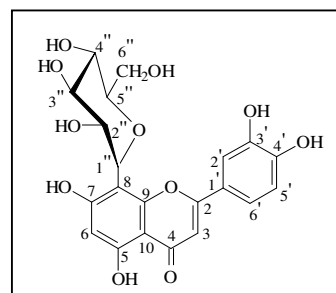
Eupomatenóide-3 (**24**)



Eupomatenóide-5 (**16**)



Conocarpano (**15**)



Orientina (**56**)

A atividade antifúngica da espécie vegetal em estudo deve-se a presença em sua composição química das neolignanas eupomatenóide-5 e conocarpano e a flavona orientina ativos contra fungos dermatófitos.

#### 5.9.2.2 Atividade Antibacteriana

O ensaio realizado pelo método da bioautografia nos revelou que o extrato metanólico bruto da *Piper solmsianum* C.DC. var. *solmsianum* apresenta uma atividade antimicrobiana significativa, sendo mais ativo contra a bactéria gram-positiva *Staphylococcus aureus*.

Foram encontradas três zonas diferentes de inibição no ensaio bioautográfico. Uma delas correspondendo ao conocarpano, a outra é devido ao Eupomatenóide-5 e a terceira zona de inibição é de um composto não isolado na presente investigação fitoquímica. Além disso, foi possível detectar que os compostos ativos estão presentes no extrato bruto e nas frações diclorometano e hexano.

Quando extrato, frações e compostos puros mostraram  $\text{CIM} \leq 1000 \mu\text{g/mL}$  foram considerados ativos. As tabelas 36 e 37 mostram os resultados obtidos pelo método da diluição em agar. O extrato metanólico bruto (EMB) inibiu o crescimento das cepas de *B. cereus*, *S. aureus*, *S.saprophyticus* e *S. agalactie* com valores de CIM de 10, 30 e 60  $\mu\text{g/mL}$ , respectivamente, e 800  $\mu\text{g/mL}$  para *C. albicans*. A atividade antimicrobiana também foi verificada para as frações hexano e diclorometano, no entanto a fração acetato de etila foi praticamente inativa contra os microorganismos testados, exceto para *B. cereus* e *S. agalactie* com CIM de 800 e 300  $\mu\text{g/mL}$ , respectivamente<sup>162</sup>.

TABELA 36 – Atividade antimicrobiana de extrato, frações e compostos de *P. solmsianum* contra bactérias Gram-positivas, expressos como concentração inibitória mínima<sup>162</sup>

AMOSTRA	CIM ( $\mu\text{g/mL}$ )			
	<i>B. cereus</i>	<i>S. aureus</i>	<i>S. saprophyticus</i>	<i>S. agalactie</i>
EMB	10	10	30	6
F. HEX.	20	20	100	10
F. DCM.	20	9	30	6
F. AE	800	> 1000	> 1000	300
E -3	> 1000	> 1000	> 1000	> 1000
E - 5	6	3	> 1000	2
COM	5	4	7	4
ORIEN	> 1000	200	600	1000

NOTAS: amostra: Extrato metanólico bruto (EMB), fração hexano (F.HEX.), fração diclorometano (F.DCM), fração acetato de etila (F. AE), eupomatenóide-3 (E-3), eupomatenóide-5 (E-5), conocarpano (CON) e orientina (ORIEN), *Bacillus cereus* (*B. cereus*), *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*), *Staphylococcus saprophyticus* (*S. saprophyticus*) e *Streptococcus agalactie* (*S. agalactie*).

TABELA 37 – Atividade antimicrobiana de extrato, frações e compostos de *P. solmsianum* contra bactérias Gram-negativas, expressos como concentração inibitória mínima

AMOSTRA	CIM (µG/ML)			
	<i>E. coli</i>	<i>S. typhimurium</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>E. cloacae</i>
<b>BEM</b>	> 1000	> 1000	> 1000	> 1000
<b>F. HEX.</b>	> 1000	> 1000	> 1000	> 1000
<b>F. DCM.</b>	> 1000	> 1000	> 1000	> 1000
<b>F. AE</b>	> 1000	> 1000	> 1000	> 1000
<b>E -3</b>	> 1000	> 1000	> 1000	> 1000
<b>E – 5</b>	> 1000	> 1000	> 1000	> 1000
<b>COM</b>	> 1000	> 1000	> 1000	> 1000
<b>ORIEN</b>	> 1000	> 1000	> 1000	> 1000

NOTAS: amostra: Extrato metanólico bruto (**EMB**), fração hexano (**F.HEX.**), fração diclorometano (**F.DCM.**), fração acetato de etila (**F. AE**), eupomatenóide-3 (**E-3**), eupomatenóide-5 (**E-5**), conocarpano (**CON**) e orientina (**ORIEN**), *Escherichia coli* (**B. coli**), *Salmomella typhimurium* (**S. typhimurium**), *Pseudomonas aeruginosa* (**P. aeruginosa**) e *Enterobacter cloacae* (**E. cloacea**).

Os mais baixos valores de CIM foram obtidos contra *S. aureus* e *B. cereus*. Não foi observada atividade contra bactérias Gram-negativas. Isso pode ser explicado porque a membrana externa da bactéria Gram-negativa é conhecida por apresentar barreira na penetração de numerosas moléculas antibióticas, e o espaço periplasmático contém enzimas, as quais são capazes de impedir a entrada de moléculas estranhas introduzidas do meio externo<sup>158, 159</sup>.

O conocarpano e o eupomatenóide-5 foram os compostos com melhor atividade. As bactérias Gram-positivas e as leveduras foram as mais sensíveis ao conocarpano, o qual mostrou valores de CIM de 5 µg/mL contra *B. cereus*, 4 µg/mL contra *S. aureus*, 7 µg/mL contra *S. saprophyticus*, 4 µg/mL contra *S. agalactie* e 30 µg/mL. O eupomatenóide-5 apresentaram excelente atividade contra bactérias Gram-positivas, com potencial similar aos antibióticos utilizados na terapêutica antimicrobiana. O flavonóide orientina obteve os seguintes valores de CIM: 200 µg/mL contra *S. aureus*, 600 µg/mL contra *S. saprophyticus* e 1000 µg/mL contra *S. agalactie*<sup>162</sup>.

A atividade antimicrobiana em espécies da família Piperaceae tem sido encontrada com amidas, óleos essenciais, lignana, neolignanas, alcalóides,

fenilpropanóides. As neolignanas presentes em *P. solmsianum* podem ser as principais responsáveis pela atividade antimicrobiana desta planta, entretanto, a neolignana eupomatenóide-3 não foi ativa contra os microorganismos testados<sup>74, 162, 163</sup>.

Os mais potentes efeitos inibitórios foram observados com extrato, frações e compostos puros com baixa polaridade, os quais podem ter propriedades que possibilitem-lhes penetrar nas células e afetar alguns metabolismos alvos. Em conclusão, a atividade antimicrobiana de *Piper solmsianum* parece estar relacionada principalmente aos compostos conocarpano e eupomatenóide-5, entretanto, foi verificado que outro composto ativo está presente, mas não foi isolado. A atividade antimicrobiana das neolignanas pode estar relacionada com a presença de um grupo hidroxila na posição 4' da estrutura fenil-propeil – benzofurano. Segundo, COWAN (1999)<sup>164</sup> a posição e o número de grupos hidroxilas (OH) fenólicas estão relacionados a toxicidade relativa aos microorganismos. Evidencia-se que aumentando-se o número de hidroxilas na molécula aumenta a toxicidade aos microorganismos<sup>164</sup>.

Diante do exposto, destacamos a *Piper solmsianum* C.DC. var. *solmsianum* como uma espécie vegetal promissora no desenvolvimento de novos fármacos os quais sejam úteis no tratamento de infecções fúngicas e bacterianas.

### 5.9.3 Avaliação do mecanismo de ação por *Neurospora crassa*

O ensaio da *Neurospora crassa* permite avaliar macroscopicamente os inibidores da parede celular fúngica. Nos últimos anos, a parede celular tem sido considerada como um alvo sumamente útil para detectar agentes antifúngicos seletivos e, portanto, não tóxicos para o hospedeiro. A diferença mais marcante entre células fúngicas e humana é que somente as primeiras possuem parede celular<sup>165</sup>. A parede celular serve como proteção, evita a sua ruptura osmótica e confere forma. As células humanas carecem de parede e fazem que antifúngicos que atuam por este mecanismo sejam drogas específicas e, portanto seguras. A parede celular fúngica está formada por muitos componentes macromoleculares, entre eles, os betaglucanos, quitina e outros<sup>166</sup>. Três atividades enzimáticas têm mostrado ser essencial para a formação da



parede antifúngica: 1,3 beta glucano, 1,6 betaglucano sintase e quitina sintase que catalizam a formação de 1,3 e 1,6 beta glucanos e quitina respectivamente e, portanto, são alvos atrativos para o descobrimento de novos medicamentos antifúngicos<sup>164</sup>. A inibição da parede celular antifúngica pode ser feita por ensaios celulares e enzimáticos como: bioensaios pela má formação de hifas, bioensaios da *Neurospora crassa* e com sorbitol.<sup>167</sup>. O bioensaio com da *Neurospora. crassa* é bastante utilizado em produtos naturais, quando se quer descobrir qual é o mecanismo de ação do fungo em estudo.

Foi avaliado o mecanismo de ação antifúngico do composto conocarpano através de ensaio *in vitro* com a *Neurospora crassa*. Para a realização deste método é necessário que o componente a ser testado seja ativo contra o fungo leveduriforme *Candida albicans* (tabela 38). Devido a este fato o ensaio foi realizado com o extrato bruto metanólico, frações hexano e diclorometano e o conocarpano. Tanto o extrato metanólico bruto, como as frações hexânica e diclorometano e o composto puro conocarpano inibiram o fungo *Neurospora crassa*, demonstrado pelo halo claro. Embora tenham, inibido o fungo, não foi observada malformações das hifas, indicando que não atuam inibindo a parede celular<sup>102</sup>.

TABELA 38 – Halo de inibição formados nos ensaios com *Neurospora crassa* para a verificação do mecanismo de ação sobre a parede celular fúngica

<b>PRODUTO</b>	<b>CARACTERÍSTICA DO HALO</b>
Extrato bruto	Halo claro
Fração hexânica	Halo claro
Fração diclorometano	Halo claro
<b>Conocarpano</b>	Halo claro

A utilização de plantas medicinais tornou-se um recurso terapêutico alternativo de grande aceitação pela população e vem crescendo junto a comunidade médica, desde que sejam utilizadas plantas cujas atividades biológicas cujas atividades biológicas tenham sido investigadas cientificamente, comprovando sua eficácia e segurança. A importância das plantas medicinais deve-se também por sua contribuição

como fonte natural de fármacos e por proporcionar grandes chances de obter-se uma molécula protótipo devido à diversidade de constituintes presentes nestas.

Assim, o presente estudo que teve por objetivos a investigação da composição química, dos seus efeitos biológicos e o controle de qualidade da espécie vegetal *Piper solmsianum* C. DC. *solmsianum* visando a validação científica desta espécie medicinal da flora brasileira.

## CONCLUSÕES

Os estudos fitoquímicos e biológico realizado com as folhas de outono da *Piper solmsianum* C.DC. var. *solmsianum* permitiram concluir que:

### a) Estudo Fitoquímico:

- por procedimentos cromatográficos foi isolado e purificado da fração hexânica três neolignan benzo-furânicas, as quais foram identificadas por RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  como sendo eupomatenóide-3, eupomatenóide-5 e conocarpano. O eupomatenóide-5 é o constituinte químico majoritário;
- a fração diclorometano apresenta como constituinte químico majoritário o conocarpano;
- da fração acetato de etila foi isolado e purificado por cromatografia em coluna duas flavonas e duas flavanonas as quais foram identificadas por técnicas espectroscópicas como sendo orientina e 7-metoxi-apigenina (genkwanina), hesperidina e luteolina 7 – rutinosídeo respectivamente. A orientina é o constituinte químico majoritário desta fração;
- por reações de metilação, benzoilação e acetilação obteve-se os respectivos derivados do conocarpano;
- por reações de dimerização oxidativa do isoeugenol obteve-se os análogos ao conocarpano,  $\alpha$  - di – isoeugenol e dehidrodiisoeugenol.

### b) Estudo biológico:

- no ensaio bioautográfico foram encontradas três zonas diferentes de inibição da bactéria Gram-positiva *Staphylococcus aureus*, uma delas corresponde ao conocarpano, a outra ao eupomatenóide-5 e a terceira mancha se refere a um composto que não foi isolado nesta espécie vegetal ainda;
- o extrato metanólico bruto, as frações hexano e diclorometano, e os compostos conocarpano e eupomatenóide-5 da *Piper solmsianum* exibiram significativa atividade antimicrobiana contra bactérias Gram-positivas, entretanto não foram ativos contra bactérias Gram-negativas;

- os mais potentes efeitos inibitórios, contra bactérias Gram-positivas, foram observados com o extrato metanólico bruto, frações e compostos apolares como o conocarpano e o eupomatenóide-5;
- os constituintes químicos da *Piper solmsianum* exibiram pronunciada atividade antifúngica contra fungos dermatófitos testados, sendo mais ativos que o cetoconazol;
- o conocarpano e a orientina são os principais compostos bioativos presentes nas folhas de outono da *Piper solmsianum*;
- somente o conocarpano foi capaz de inibir fungos do gênero *Aspergillus* e *Candida*;
- no ensaio da *Neurospora crassa* foi possível detectar que o conocarpano não atua inibindo a parede celular fúngica.

c) Atividade Farmacológica:

- o potencial analgésico do conocarpano e seus derivados, pelo modelo experimental das contorções abdominais induzidas pelo ácido acético e verificou-se que o derivado acetilado do conocarpano demonstrou ser o derivado mais ativo enquanto que o conocarpano benzoilado foi inativo;
- os análogos do conocarpano  $\alpha$  - di- isoeugenol como o diidrodiisoeugenol demonstraram significativa atividade analgésica;
- quanto ao potencial antinociceptivo verificou-se que a fração hexânica foi inativa enquanto que as frações dicloromerano e acetato de etila demonstraram uma atividade significativa. A atividade analgésica da fração diclorometano deve-se ao conocarpano enquanto que a atividade analgésica da fração acetato de etila deve-se a orientina;
- a orientina apresentou efeito analgésico bem mais potente, do que os analgésicos comerciais aspirina e tylenol;
- os resultados obtidos com a orientina indicam que o efeito antinociceptivo seria através de mecanismos semelhantes àqueles descritos para outras substâncias analgésicas/ antiinflamatórias como a aspirina e indometacina;

- os resultados obtidos no presente estudo justificam o uso desta espécie vegetal na medicina popular para o tratamento de processos dolorosos.

d) Controle de Qualidade Sazonal:

- o diclorometano é o melhor solvente para a extração do conocarpano e o eupomatenóide-3;
- o hexano é o melhor solvente para a extração do eupomatenóide-5;
- a maior concentração de conocarpano em *Piper somsianum* ocorre nas raízes do outono e nas flores de verão;
- as flores de outono apresentam maiores concentrações de eupomatenóide-3 enquanto que as flores de verão apresentam maior concentração de eupomatenóide-5;
- a orientina esta presente nas folhas de outono e primavera da espécie vegetal *Piper solmsianum*;
- a Genkwanina (7-metoxi-apigenina) encontra-se em maior concentração nas flores de verão e a hesperidina nas folhas da primavera.

## 6. REFERÊNCIAS

1. GOLBERG, H.S. De la Fitoterapia a la Fitomedicina. **Fitociencia**, n.4, p.16-17, dez.1999.
2. STRAUSS, C. **A ciência do concreto. In: O pensamento selvagem**. Campinas, Papirus Editora, p 15-50,1989.
3. BARREIRO, E.J.; FERREIRA, V.F.; COSTA, P.R.R. Substâncias Enantioméricamente puras (SEP): A Questão dos Fármacos Quirais. **Química Nova**, v.20, n.6, p.647-655, 1997.
4. LIMA, L.M.; FRAGA, C.A.M.; BARREIRO, E.J. O Renascimento de um Fármaco: Talidomida. **Química Nova**, v.24, n.5, 2001.
5. MORRISON, R.; BOYD, R. **Química Orgânica**. Lisboa, Fundação Calouste Gulbenkian, 13<sup>a</sup> ed., p. 164, 1996.
6. CORDELL, G.A. Changing Strategies in Natural Products Chemistry. **Phytochemistry**, v.40, n.6, p.1585 – 1612, 1995.
7. SILVA, P. **Farmacologia**. Rio de Janeiro, Editora Guanabara Koogan, 6<sup>a</sup> ed., p.134 –145, 2002.
8. STEPP, J.R. The Role of Weeds as Sources of Pharmaceuticals. **Journal of Ethnopharmacology**, 92, p. 163-166, 2004.
9. LOZOYA, X. Fármacos de Origen Vegetal de Ayer y de Hoy. **Investigación y Ciencia**, p.4 –10, nov/1997.
10. RATES, S.M.K. Plants as Source of Drugs. **Toxicon**, 39, p. 603-613, 2001.
11. KINGHORN, A.D. Pharmacognosy en the 21<sup>st</sup> century\*. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, 53, p. 135-148, 2001.
12. CALIXTO, J.B. *et al.* Naturally Occuring Antinociceptive Substances From Plants. **Phytotherapy Reserch**, 14, p.401- 418, 2000.
13. HOUGHTON, P.J. Old Yet New Pharmaceuticals From Plants. **Journal of Chemical Education**, v.78, n.2, feb / 2001.

14. PHILLIPSON, J.D. Phytochemistry and Medicinal Plants. **Phytochemistry**, v.56, p.237 – 243, 2001.
15. VROMAN, J.A.; GASTON, M.A.; AVERY, M, A. Current Progress in the Chemistry. Medicinal Chemistry and Drug Design of Artemisinin Based Antimalarials. **Current Pharmaceutical Design**, v.5 , n.2, p.101 – 133,1999.
16. BRESOLIN,T.M.B.& CECHINEL-FILHO, V. **Ciências Farmacêuticas: Contribuição ao Desenvolvimento de Novos Fármacos e Medicamentos**. Itajaí, Editora da UNIVALI, 1<sup>a</sup> ed. p. 239, 2003.
17. ALMEIDA, *et al.* Câncer e Agentes Antineoplásicos Ciclo-celular Específicos e Ciclo – celular não Específicos que Interagem com o DNA: uma Introdução. **Química Nova**, v. 28, n.1, p. 118-129, 2005.
18. LIISTRO, F. *et al.* First Clinical Experience With a Paclitaxel Derivate – Eluting Polymer Stent System **Implantation for In – Stent Restenosis**. **Circulation**, n.105, p. 1883-1886, 2002.
19. RATES, S. & SANTOS, L. *Piper methysticum* Forst (Piperaceae) um novo ansiolítico. **Revista Brasileira de Farmácia**, v.78, n.2, p.44-48, 1997.
20. DHARMARATNE, H.R.W.; NANAYAKKARA, N.P.D.; KHAN, I.A. Kavalactones From *Piper methysticum*, and Their <sup>13</sup>C RMN Spectroscopic Analyses. **Phytochemistry**, 59, p.429-433, 2002.
21. MACIEL, M.A.M. *et al.* Plantas Medicinais: A Necessidade de Estudos Multidisciplinares. **Química Nova**, v.25, n.3, p.429 – 438, 2002.
22. DAVID, J.P.L.; NASCIMENTO, J.A.P.; DAVID, J.M. Produtos Fitoterápicos: Uma Expectativa de Negócio para a Indústria, um Campo Pouco Explorado Pelos Farmacêuticos. **Infarma**. v.6, n.9-10, p.71 – 80, 2004.
23. WHO. Drug Information. **Medicine Herbal**, v.14, n.4, p237-243, 2000.
24. OLIVEIRA, A.B.& BRAGA, F. C. Produtos Naturais Bioativos de Plantas Brasileiras e sua Contribuição para o Desenvolvimento da Química Medicinal. **Arquivos Brasileiros de Fitomedicina Científica**, v.1, p. 49-58, maio, 2003.
25. BRANDÃO, M.G.L. Recomendações para a Avaliação da Qualidade de Drogas e Extratos Vegetais pelas Farmácias de Manipulação. **Informa**, v. 6, n.1/2, p. 6-7,1997.

26. BAUER, R.; TITTEL, G. Quality Assessment of Herbal Preparations as a Precondition of Pharmacological and Clinical Studies. **Phytomedicine**, v.2, n.3, p. 193 – 198, 1996.
27. CORREA JÚNIOR, C.; MING, L.C.; SCHEFFER, M.C. **Cultivo de Plantas Medicinais, Condimentares e Aromáticas**. Curitiba, Emater, p.162, 1991.
28. VILEGAS, J.H.Y; LANÇAS, F.M.; ANTONIOSI FILHO, N.R. High Temperature GC Análisis of Phytopreparations of “Espinheira Santa” (*Maytenus ilicifolia* M. and *Maytenus aquifolium* M. – Celastraceae), a Brazilian Antiulcer Planta. **Chromatographia**, v.40,n.5/6, p. 341-344, mar/1995.
29. CALIXTO, J.B. **Efficacy**, Quality, Control, Marketing and Regulatory Guidelines for Herbal Medicines (Phytotherapeutics Agents). **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v.33, n.2, p.179 – 189, 2000.
30. CALIXTO, J.B. Biopirataria: A Diversidade Biológica na Mira da Indústria Farmacêutica. **Ciência Hoje**, v.28, n.167, p.36 - 43, dez/2000.
31. PINTO, A. C. *et al.* Produtos Naturais: Atualidade, Desafios e Perspectivas. **Química Nova**, v.25, n.1, p. 45-61, 2002.
32. YUNES, R.A.; PEDROSA, R.C.; CECHINEL-FILHO, V. Fármacos e Fitoterápicos: A Necessidade do Desenvolvimento da Indústria de Fitoterápicos e Fitofármacos no Brasil. **Química Nova**, v.24, n.1, p.147-152, 2001.
33. HECK, M.C. **Conservação, Manejo e Legislação de Plantas Medicinais**. In: WORKSHOP DE PLANTAS MEDICINAIS DE BOTUCATÚ, II, Botucatu, 14-15 /06 /1996. Anais. Botucatu, p.17.
34. RODRIGUES, E.; CARLINI, E.L.A. Levantamentos Etnofarmacológicos. Sua Importância no Desenvolvimento de Fitomedicamentos. **Revista Racine**, n.70, p.30 – 34, set./out. 2002.
35. GRUENWALD, J. El Mercado de los Productos Derivados de las Plantas Medicinales en Europa. **Fitociencia**, n.2, p.8 – 9, abr/ 1998.
36. PARAJARA, F.; CANÇADO, P. Dinheiro dá em Árvore. **Forbes**, n.17, p.40-45, mai/2001.
37. CECHINEL – FILHO, V. & YUNES, R.A. Estratégias para a Obtenção de Compostos Farmacologicamente Ativos a Partir de Plantas Medicinais. Conceitos



- sobre Modificação Estrutural para Otimização da Atividade. **Química Nova**, v.21, n.1, p. 99 – 103, 1998.
38. SIMÕES, C. M. O. *et al.* **Farmacognosia: da Planta ao medicamento**. Porto Alegre/Florianópolis: Ed. Universidade / UFRGS / Ed.da UFSC, p. 821, 1999.
39. KUKLINSKI, C. **Farmacognosia: Estudio de las Drogas y Sustancias Medicamentosas de Origen Natural**. Barcelona, Ediciones Omega S.A., p.515, 2000.
40. HOUGHTON, P.J.; RAMAN, A. **Laboratory Handbook for the Fractionation of Natural Extracts**. Londres, Chapman & Hall, 1<sup>a</sup> ed., p.199, 1998.
41. MATOS, F.J.A. **Introdução à Fitoquímica Experimental**. Fortaleza, Edições UFC, p.126, 1988.
42. WAGNER, H.; BLADT, S.; ZGAINSKI, E. M. **Plant Drug Analysis**. Alemanha: Springer – Verlag Berlin Heidelberg, p. 320, 1984.
43. COLLINS, C.H.; BRAGA, G.L; BONATO, P.S. **Introdução a Métodos Cromatográficos**. Campinas. Editora da UNICAMP, p. 279, 1990.
44. DEGANI, A.L.; CASS, Q.B.; VIEIRA, P.C. Cromatografia um Breve Ensaio. **Química Nova na Escola**, n.7, p.21-25, mai/1998.
45. SKOOG, D.A. *et al.* **Princípios de Análise Instrumental**. Porto Alegre, Bookman, 5<sup>a</sup> ed., p.628, 2002.
46. SILVERSTEIN, R.M.; BASSLER, C.G.; MORRIL, T.C. **Identificação Espectrométrica de Compostos Orgânicos**. Rio de Janeiro, Editora Guanabara Koogan S.A., 5<sup>a</sup> ed., p.387, 1994.
47. CRONQUIST, A. **An Integrated System of Classification of Flowering Plants**. New York Colombia University Press, p.1262 il., 1981.
48. JOLY, A.B. **Botânica: Introdução à Taxonomia Vegetal**. São Paulo, Ed. Nacional, 10<sup>a</sup> ed., p.777, 1991.
49. BARROSO, G.M. **Sistemática de Angiosperma do Brasil**. São Paulo: EDUSP, V.1, 1978.

50. MOREIRA, D.L.; GUIMARÃES, E.F.; KAPLAN, M.A.C. A C – Glucosylflavone from Leaves of *Piper lhotzkyanum*. **Phytochemistry**, v.55, p. 783-786, 2000.
51. PARMAR, V.S. *et al.* Phytochemistry of the Genus Piper. **Pytochemistry**, v.46, n. 4, p. 597-673, 1997.
52. LEAL, L F. **Estudo Químico e Avaliação da Atividade Farmacológica e Microbiológica de *Piper mikanianum* (Kunth) Steudel**. Florianópolis, Universidade Federal de Santa Catarina, 2000, p.158. Dissertação de Mestrado em Química.
53. BENEVIDES, P.J.C; SARTORELLI, P.; KATO, M.J. Phenylpropanoids and Neolignans from *Piper regnellii*. **Phytochemistry**, v.52, p.339 – 343, 1999.
54. MOREIRA, D.L.; KAPLAN, M.A.C.; GUIMARÃES, E.F. Constituintes Químicos de *Piper solmsianum* C.DC.(PIPERACEAE). **Revista Brasileira de Farmácia**, v.76, n.4, p.106 – 109, 1995.
55. GUIMARÃES, E.F. & GIORDANO, L.C.S. **Piperaceae no Nordeste Brasileiro** In: Estado do Ceará, Rodriguésia, v. 55, n.84, p. 21-46, 2004.
56. MARTINS, R.C.C. *et al.* Phenylpropanoids and Tetrahydrofuran Lignans from *Piper solmsianum*. **Phytochemistry**, v.55, p. 843-846, 2000.
57. VEGA, M.R.G. *et al.* Chemical Constituents from *Piper fulvescens* – Complete <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C NMR Assignments of Neolignans and 3β - O-β-D- Glucopyranosil-5, 6-Epoxy - β - Sitosterol. **Revista Latinoamericana de Química**, v.29, n.2, p. 63-72, 2001.
58. SANTOS, P.R.D. *et al.* Essential oil Análisis of 10 Piperaceae Species from the Brazilian Atlantic Forest. **Phytochemistry**, v.58, p.547-551, 2001.
59. REITZ, R. **Piperaceae**. In: Flora Ilustrada Catarinense. Itajaí: Herbário Barbosa Rodrigues, p. 4 – 7, 2003.
60. BIZERRIL, M.X.A., *et.al.* Feeding Behaviour of Bats and the Dispersal of *Piper arboreum* Seeds in Brazil. **Journal of Tropical Ecology**, n. 14, p.109-114, 1998.
61. YUNKER, T.G. The Piperaceae of Brazil. **Hoehnea**, v.3, p.106-107, 1973.
62. BRUNETON, J. **Elementos de Fitoquímica y de Farmacognosia**. 1.ed. Espanha: Editorial Acribia, S.A.,1991. p.594.

63. III JORNADA PAULISTA DE PLANTAS MEDICINAIS / I ENCONTRO RACINE DE FITOTERAPIA E FITOCOSMÉTICO. Out./1997, Campinas. **Taninos e Lignanas: Características Químicas, Farmacológicas e de Manipulação.** RACINE Qualificação e Assessoria S/C Ltda, p. 29.
64. SARTORELLI, P. *et. al.* Enantioselective conversion of p-hydroxypropenylbenzene to (+)-conocarpan in *Piper regnellii*. **Plant Science**, v.161, p. 1083 – 1088, 2001.
65. JENSEN, S.; HANSEN, J.; BOLL, P. M. Lignanas and Neolignanas From Piperaceae. **Phytochemistry**, v. 33, n.3, p. 523- 530, 1993.
66. CHAURET, D.C. *et al.* Insecticidal Neolignanas from *Piper decurrens*. **Journal of Natural Products**, v.59,n.2, p. 152-155,1996.
67. FREIXA, B. *et al.* Antifungal Principles from *Piper fulvescens*. **Planta Médica**, v.67, p.873-875, 2001.
68. BHANDARI, S.P.S.; *et.al.* A Lignan From *Piper chaba* Stems. **Phytochemistry**, v.47, n. 7, p. 1435-1436, 1997.
69. ZHENG, S.L.;YU, W.Y.;XU, M.X.; CHE, C.M. First synthesis of naturally occurring ( $\pm$ ) – *epi*-conocarpan. **Tetrahedron Letters**, v.44, p.1445-1447, 2003.
70. MARTINS, R.C.C.; LAGO, J.H.G.; ALBUQUERQUE, S.; KATO, M.J. Trypanocidal Tetrahydrofuran Lignans from Inflorescences of *Piper solmsianum*. **Phytochemistry**, v.64, p. 667 – 670, 2003.
71. PIETTA, P.G. Flavonoids as Antioxidants. **Journal Natural Products**, v.63, n.17, p.1035-1042, 2000.
72. UGAZ, O. L. **Investigación Fitoquímica. Métodos en el Estudio de Productos Naturales.** Peru: Pontificia Universidad Catolica del Peru, Fondo Editorial, 2º ed, p. 299, 1994.
73. FACUNDO,V.A.; MORAIS, S.M.; BRAZ FILHO, R. Constituintes Químicos de *Ottonia corcovadensis* Miq. da Floresta Amazônica – Atribuição dos Deslocamentos Químicos dos Átomos de Hidrogênio e Carbono. **Química Nova**, v. 27, n.1, p.79-83, 2004.
74. DANELUTTE, A.P., *et. al.* Antifungal Flavanones and Prenylated Hydroquinones From *Piper crassinervium* Kunth. **Phytochemistry**, v.64, p.555-559, 2003.

75. COWAN, M.M. Plant Products As Antimicrobial Agents. **Clinical Microbiology Reviews**, p.564 – 582, October, 1999.
76. SANTOS, H.M.K. *et. al.* RP - HPLC Method for Determination of Piperine from *Piper longum* L. and *Piper nigrum* L. **E-Journal of Chemistry**, vol. 2, n.7, March, 2005.
77. COFFIGNY, M.R.A., *et. al.* Evaluación de la Actividad Antiulcerosa del 2''-O-ramnosil-4''-O-metil-vitexina de las Hojas de *Piper ossanum*. **Revista Cubana de Medicina Militar**, v. 29, n.2, p. 114 -117, 2000.
78. WILLIAMSON, E.M. Synergy and Other Interactions in Phytomedicines. **Phytomedicine**, v.8, n.5, p. 401-409, 2001.
79. HOLETZ, F.B. *et.al.* Screening of Some Plants Used in the Brazilian Folk Medicine for the Treatment of Infectious Diseases. **Memorial Instituto Oswaldo Cruz**, vol. 97, n.7, p. 1027-1031, october 2002.
80. CHAVES, M.C.O.& SANTOS, B.V.O. Constituents from *Piper marginatum* Fruits. **Fitoterapia**, 73, p. 547-549, 2002.
81. PESSINI, G.L. *et. al.* Antibacterial Activity of the Extracts and Neolignans from *Piper regnellii* (Miq.) C.DC.var. *pallezens* (C.DC.) Yunck. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v.98(8), p.1115 – 1120, December, 2003.
82. PESSINI, G.L. *et. al.* Antifungal Activity of Extracts and Neolignans from *Piper regnellii* (Miq.) C.DC.var. *pallezens* (C.DC.) Yunck. **Journal Brazilian Chemistry Society**, v.15, p., september, 2005.
83. GODJEVAC, D. *et. al.* Flavonoids from flowers of *Cephalaria pastricensis* and Their Antiradical Activity. **Journal Serbian Chemical Society**. v.69, n.11, p. 883-886, 2004.
84. VENDRAMINI, A.L.A. & TRUGO. L.C. Phenolic Compounds in Acerola Fruit (*Malphigia puniceifolia*, L.). **Journal Brazilian Chemical Society**, v.15, n.5, p. 664-668, 2004.
85. OLSZEWSKA, M. & WOLBIS, M. Flavonoids from the Leaves of *Prunus spinosa* L. **Polish Journal Chemical**, v.76, p. 967 – 974, 2002.
86. HARBORNE, J.B.; WILLIAMS, C.A. Review: Advances in Flavonoid Research Since 1992. **Phytochemistry**, v.55, p. 481-504, 2000.

87. BUTLER, M.S. Natural Products to Drugs: Natural Product Derived Compounds in Clinical Trials. **Natural Product Reports**, v.22, p.162-195, 2005.
88. 2000 YEARS OF NATURAL PRODUCTS RESEARCH. PAST, PRESENT AND FUTURE. July/1999, Amsterdam. Idiolites from microorganisms: a brilliant past, a bright future. **Phytoconsult**, p. 15-39.
89. BERGOLD, A.M. & GEORGIAIDIS, S. Novidade em Fármacos Antifúngicos: uma Revisão. **Visão Acadêmica**, v.5,n.2,p.159-172, jun/Dez, 2004.
90. AMARAL, V.C.S. *et al.* Terapias Antifúngicas na Gestação: Riscos e Perspectivas. **Infarma**, v.13. n.3/4, p. 87 – 91, 2001.
91. CEHINEL FILHO, V. **Obtenção de Compostos Farmacologicamente Ativos a Partir de Produtos Naturais: Correlação Estrutura Química-Atividade Farmacológica**. Florianópolis, Universidade Federal de Santa Catarina, 1995. p. --  
- Tese de Doutorado em Química.
92. AL-FARHAN, E.; KEEHN, P.M.; STEVENSON, R. Dimerization of Isoeugenol, Isoeugenyl Methyl Ether and Isoeugenyl Acetate. **Journal Chemical Research (S)**, n.1, p.100-102, 1992.
93. ATSUMI, T. *et al.* Cytotoxicity and Radical Intensity of Eugenol, Isoeugenol or Related Dimers. **Anticancer Research**, n.20, p. 2519 - 2524, 2000.
94. SILVA, R.S. **Estudo Fitoquímico e Biológico das Partes Aéreas da *Mikania lanuginosa* DC (ASTERACEAE)**. Florianópolis, Universidade Federal de Santa Catarina, 2000, p. 129. Dissertação de mestrado em Química.
95. BRESCIANI, L.F.V.; YUNES, R.A.; CECHINEL - FILHO, V. Comprative Study of Different Parts of *Wedelia paludosa* DC by Gas Chromatography. **Natural Product Letters**, v.14. n.4, p. 247 – 254,1999.
96. RIBANI, M. *et. al.* Validação em Métodos Cronatográficos e Eletroforéticos. **Química Nova**, vol 2, n.5, p. 771-780, 2004.
97. PAIVA, S.R. *et al.* Perfil Cromatográfico de Duas Espécies de Plumbaginaceae: *Plumbago scandens* L.e *Plumbago auriculata* LAM. **Química Nova**, v.25, n.5, p. 717 – 721, 2002.
98. ZIMMERMANN, M. Ethical Guidelines for Investigations of Experimental Pain in Conscious Animals. **Pain**, v. 16, pag. 109-110, 1983.

99. COLLIER, H.O.J.; DINNEEN, L.C.; JOHNSON, C.A.; SCHNEIDER, C. The Abdominal Constriction Response and its Suppression by Analgesic Drugs in the Mouse. **British Journal of Pharmacology**, v. 32, p. 295–310, 1968.
100. BENTLEY, G.A, NEWTON, S.H.; STARR, J. Evidence for an Action of Morphine and the Enkephalins on Sensory Nerve Endings in the Mouse Peritoneum. **British Journal of Pharmacology**, v.73, p. 325-332, 1981.
101. HUNSKAAR, H.S.; HOLE, K. The Formalin test in Mice: Dissociation Between Inflammatory and Non – inflammatory Pain. **Pain**, v.30, p.103-114, 1987.
102. CAMPOS, M.P. **Análise do Potencial Antimicrobiano de Extratos, Frações e Compostos Puros Obtidos de *Piper solmsianum* C.DC. variedade *solmsianum***. Itajaí, Universidade do Vale do Itajaí, 2005. Dissertação de mestrado em Ciências Farmacêuticas.
103. CAMPOS, M.P. *et.al.* Evaluation of Antifungal Activity of *Piper solmsianum* C.DC. var. *solmsianum* (PIPERACEAE). **Biological Pharmaceutical Bulletin**, v.28, n.8, p.1527-1530, 2005.
104. WOODS, G. L.; WASHINGTON, J. A. **Antibacterial susceptibility tests: dilution and disk diffusion methods**. In: MURRAY, P. R. (ed.) *Manual of clinical microbiology*. 6th ed. Washington : ASM Press, p.1327-1341, 1995.
105. RAHALISON, L. *et al.* Antifungal tests in phytochemical investigations: comparison of bioautographic methods using phytopathogenic and human pathogenic fungi. **Planta Medica**, n. 60, v.1, p.41-44, Feb. 2004.
106. SELITRENNIKOFF, C.P.; VIGERS, A.J. & Roberts, W.K **Antifungal proteins from plants: a possible new source of human therapeutics**. in **New Approaches for Antifungal Drugs**, ed. Fernandez, P.B., Birkhauser, Boston, pp. 88-113, 1992.
107. ZACCHINO, S. *et al.* *In Vitro* Studies on Mode of Action of Antifungal 8-O. 4'- Neolignanas Occurring in Certain Species of *Virola* and Related Genera of Myristicaceae. **Journal of Ethnopharmacology**, 62, p.35-41, 1998.
108. MEYER, B. N. *et.al.* Brine Shrimp: A Convenient General Bioassay for Active Plant Constituents. **Planta Medica**, v. 45.p. 31 – 34, 1982.
109. YUNES, R.A. & CALIXTO, J.B. **Plantas Medicinais sob a Ótica da Química Medicinal Moderna**. Chapecó, Editora Argos, 1<sup>a</sup> ed., p.523, 2001.

110. HAQUE, E. *et al.* Triterpenoids From the Stem Bark of *Adina cordifolia*. Dhaka **University Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.3, n.1-2 Jun – Dez, 2004.
111. SOUZA, A.D.L. *et al.* Constituintes Químicos de *Gustavia augusta* L. (LECYTHIDACEAE). **Química Nova**, v.24, n.4, p. 439-442, 2001.
112. CARINI, M. *et al.* Antioxidant and Photoprotective Activity of a Lipophilic Extract Containg Neolignans From *Krameria triandra* Roots. **Planta Médica**, v.68, n.3, p. 193-197, Mar. 2002.
113. LIN, J.H. *et al.* Isolation and Cytotoxicity of Flavonoids from *Daphnis Genkwae* flos. **Journal of Food and Drugs Analysis**, v.9,n.1, p. 6-11, 2001.
114. AHMED, M.S. *et.al.* A Weakly Antimalarial Biflavanone from *Rhus retinorrhoea*. **Phytochemistry**, v.58, p.599 – 602, 2001.
115. VERDI, L.G.; BRIGHENTE, I.M.C.; PIZZOLATTI, M.G. Gênero *Baccharis* (ASTERACEAE): Aspectos Químicos, Econômicos e Biológicos. **Química Nova**, v.28, n.1, p.85-94. 2005.
116. FACUNDO,V.A.; MORAIS, S.M.; BRAZ FILHO, R. Constituintes Químicos de *Ottonia corcovadensis* MIQ. da Floresta Amazônica – Atribuição dos Deslocamentos Químicos dos Átomos de Hidrogênio e Carbono. **Química Nova**, v.27, n.1, p.79-83, 2004.
117. KUMAZAWA, T. *et al.* Synthesis of 8-C-glucosylflavones. **Carbohydrate Research**, v.334, p. 183-193, 2001.
118. BIANCO, E.M.; SANTOS, C.A.M. Substâncias Isoladas das Folhas de *Bauhinia microstachya* (Raddi) Macbr. (Caesalpinaceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.13, n.2, p.93-99, 2003.
119. MUN'IM, A. *et al.* Antioxidant Compounds from *Crotolaria sessiflora*. **Bioscienc Biotechnology Biochemistry**, v.67, n.2, p. 410-414, 2003.
120. LATTE, K.P. *et al.* O-Galloyl-C-glycosylflavones from *Pelargonium reniforme*. **Phytochemistry**, v.59, p. 419 – 424, 2002.
121. WEEBY, F.; MARKHAM, K.R. Isoswetiajaponin 2''- O -  $\beta$  - Arabinopyranoside and Other Flavone-C-Glycosides from the Antartic Grass *Deschampsia antarctica*. **Phytochemistry**, v. 36, n. 5, p. 1323-1326, 1994.

122. CARVALHO, M;G; COSTA, P.M.; ABREU, H.S. Flavanones from *Vernonia diffusa*. **Journal Brazilian Chemical Society**, v.10, n.2,p.163-166, 1999.
123. FERREIRA, D.T. *et. al.* Constituintes Químicos das Raízes de *Pyrostegia venusta* e Considerações Sobre a sua Importância Medicinal. **Química Nova**, v.23, n.1, p.42-46, 2000.
124. MOREIRA, F.P.M. *et. al.* Flavonóides e Triterpenos de *Baccharis pseudotenuifolia* – Bioatividade Sobre *Artemia salina*. **Química Nova**, v.26, n.3, p – 309-311, 2003.
125. PIZZOLATTI, M.G. *et.al.* Flavonóides Glicosilados das Folhas e Flores de *Bauhinia fortificata* (LEGUMINOSAE). **Química Nova**, v.26, n.4, p.466-469, 2003.
126. DAVID, J.M. *et. al.* Flavonóides e Triterpenos de *Stigmaphyllon paralias*. **Química Nova**, v.26, n.4, p. 484-487, 2003.
127. MITCHELL, K.A.; MARKHAM, K.R.; BAYLY, M.J. Flavonoid Characters Contributing to the Taxonomic Revision of the *Hebe parviflora* Complex. **Phytochemistry**, v.56, p.453-461, 2001.
128. OLIVEIRA, M.C.C. *et. al.* Flavonóides das Flores de *Stiffitia chrysantha* Mikan. **Química Nova**, v. 22, n.2, 1999.
129. NAWWAR. M.A.M. *et. al.* Flavonid Lactates from Leaves of *Marrubium vulgare*. **Phytochemistry**, v.28,n.11, p. 3201-3201, 1989.
130. GALATI, E.M. *et. al.* Biological Effects of Hesperidin, a Citrus Flavonoid: Antiinflammatory and Analgesic Activity in Rat. **Farmacology**, v.40, p. 709-712, 1994.
131. AMEER, B. *et. al.* Flavanone Absorption After Naringin, Hesperidin, and Citrus Administration. **Clinical Pharmacology Therapy**, v.60, p.34-40, 1996.
132. MIYAKE,Y. *et. al.* Protective Effects of Lemon Bioflavonoids on Oxidative Stress in Diabetic Rats. **Lipids**, v.33, p. 689-695, 1998.
133. MONFORTE, M.T. *et. al.* Biological Effects of Hesperidin, a Citrus Flavonoids. Hypolipidemic Activity on Experimental Hypercholesterolemia in Rat. **Farmacology**, v.50, p.595-599, 1995.



134. MORRISON, R. & BOYD, R. **Química Orgânica**. Lisboa, Fundação Calouste Gulbenkian, 13<sup>a</sup> ed., p.1510.
135. VOGEL, A I., **Química Orgânica-Análise Orgânica Qualitativa**. Ao Livro Técnico, Rio de Janeiro, 1985.
136. ALVES, H.M. A Diversidade Química das Plantas como Fonte de Fitofármacos. **Cadernos Temáticos de Química Nova na Escola**, n.3, p. 10 – 14, maio, 2001.
137. DONNICI, C.L. *et. al.* Métodos Sintéticos para Preparação de 2,2' – Bipiridinas Substituídas. **Química Nova**, v.25, n.5, p.668-675, 2002.
138. OLIVEIRA, L.C.P.; MAUSE, R.; NUNOMURA, S. M. Quantitative HPLC Analysis of Some Marker Compounds of Hydroalcoholic Extracts of *Piper anduncum* L. **Journal Brazilian Chemical Society**, v.16, n.6B, p. 1439- 1442, 2005.
139. NOLDIN, V.F. *et. al.* Composição Química e Atividade Biológica das Folhas de *Cynara scolymus* L. (ALCACHOFRA) Cultivada no Brasil. **Química Nova**, v.26, n.3, p. 331- 334, 2003.
140. BRANCO, A.; PIZZOLATTI, M.G. CGAR E CGAR/EM na Análise dos Constituintes Químicos Isolados do Extrato Hexânico de *Sebastiania argutidens* (EUPHORBIACEAE). **Química Nova**, v.25,n.1, p.15-19, 2002.
141. VILEGAS, J.H.Y; LANÇAS, F.M. Detecção de adulterações (HRCH). **Revista de Ciências Farmacêuticas**, n. 18, p.241, 1997.
142. VASCONSELOS, E. C. *et al.* Comparasion of Extraction and Clean- up Mehtods for the Analysis of Friedelin-3-ol and Friedelin from Leaves of *Maytenus aquifolium* Martius (CELASTRACEAE). **Phytochemical Analysis** v. 11. p. 247, 2000.
143. NOSSACK, A.C. *et. al.* Quantitativa Analysis of Tritrepenes Friedelin ans Friedelan-3-ol in *Maytenus aquifolium* by HRCG and TCG. **Phytochemistry Analysis**, v.11, p. 243-246, 2000.
144. NIERO, R. *et. al.* A Comparative Chemical Study of *Maytenus ilicifolia* Mart. Reiss and *Maytenus robusta* Reiss (CELASTRACEAE). **Zeitschrift für Naturforschung**, v.56, p.158-161, 2001.

145. CORREA JUNIO, C.; MING, L.C.; SCHEFFER, M.C. **Cultivo de Plantas Medicinais, Condimentares e Aromáticas**. Curitiba, EMATER-Paraná, p.161, 1991.
146. GARCIA, S.E. *et. al.* **Biodiversidade: Perspectivas e Oportunidades Tecnológicas. Fitoterápicos**. Disponível no site: [www.bdt.fat.org.br/publicacoes/padct/bio/cap10/index.html](http://www.bdt.fat.org.br/publicacoes/padct/bio/cap10/index.html), acesso em 3/01/06.
147. LIN, J.H. *et. al.* Determination of Flavonoids in *Daphinis genkwae* flos by High Performance Liquid Chromatography. **Journal of Food and Drug Analysis**, v. 9, n. 1, p.1-5, 2001.
148. PAMPLONA, C.R.*et. al.* Seasonal Variation and Analgesic Properties of Different Parts from *Curcuma zedoaria* Roscoe (Zingiberaceae) Grown in Brazil. **Zeitschrift für Naturforschung**, v.60, p. 2005.p.1-4, 2005.
149. ANTRI. A.E. *et. al.* Flavone Glycosides from *Calycotome villosa* subsp.intermedia. **Molecules**, v.9. p. 568 – 573, 2004.
150. CERQUEIRA, J.E.M. **Importância das Abelhas para o Planeta Terra**. Disponível no site: [www.apitherapy.com/elpidio\\_tesina\\_aic.doc](http://www.apitherapy.com/elpidio_tesina_aic.doc), acesso em 31/01/06.
151. PEREIRA, A.S.; SEIXAS, F.R.M.S.; AQUINO NETO, R. Própolis: 100 Anos de Pesquisa e suas Perspectivas Futuras. **Química Nova**, v.25, n.2, p. 321-326, 2002.
152. HARBONE, J. B. Introduction to Ecological Biochemistry. Londres, 4<sup>a</sup> Edição, **Academic press, University of Reading**, 1988.
153. VEIGA JÚNIOR, V.F.; PINTO, A.C.; MACIEL, M.A.M. **Plantas Medicinais: Cura Segura? Química Nova**, v.28 n.3, 2005.
154. SCHLEMPER, V. *et al.* **Potencial Analgésico da Marubiina Obtida da *Marrubium vulgare*. Alcance (Pesquisa)**, n.2, p36-39, 1998.
155. BRAGGIO, M.M. Atividades Farmacológicas das Folhas de *Sesbania virgata* (CAV.) PERS. **Arquivos do Instituto Biológico**, v.69, n. 4, p. 49-53, 2002.
156. PIETROVSKI, E.F. **Avaliação da Atividade Antinociceptiva do Extrato Etanólico e de Princípios Ativos Obtidos das Flores de *Combretum leprosum* Mart**. Curitiba, Universidade Federal do Paraná. Dissertação de Mestrado em Farmacologia, 2004.

157. PEREIRA, R., S. *et. al.* Atividade Antibacteriana de Óleos Essenciais em cepas isolada de Infecção Urinária. **Revista de Saúde Pública**, v.38, n.2, p.326-328, 2004.
158. POWER, R.F.; DUFFY C.F. Antioxidant and antimicrobial properties of some Chinese plant extracts. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 17, p.527- 529, 2001.
159. POOLE, K. Bacterial multidrug resistance-emphasis on efflux mechanisms and *Pseudomonas aeruginosa*. **Journal Antimicrobial Chemotherapy**, v. 34, p. 453-456, 1994.
160. CAMPOS, M. P. *et. al.* Evaluation of Antifungal Activity of *Piper solmsianum* C.DC. var. *solmsianum* (PIPERACEAE). **Biological Pharmaceutical Bulletin**, v.28, n.8, p. 1527-1530, 2005.
161. CAMPO. M P. *et. al.* Antimicrobial Activity of Extract, Fractions and Four Compounds from *Piper solmsianum* C. DC. *solmsianum* (PIPERACEAE). **Phytomedicine**, n. submetido, 2005.
162. KATO, M.J. *et. al.* **Evolução Metabólica em Espécies de PIPERACEAE**. In: XXVI Reunião Anual sobre Evolução, Sistemática Ecologia Micromoleculares. Rio de Janeiro, 1 a 3 de dezembro 2004.
163. MOREIRA, D.L. *et. al.* Effect of Leaf Essential Oil from *Piper solmsianum* C.DC. in Mice Behaviour. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**. v.73, n.1, p.33-37, Mar, 2001.
164. COWAN. M. M. Plant Products as Antimicrobial Agents. **Clinical Microbiology Reviews**, v.12, n.4, p. 564- 582, 1999.
165. ZACCHINO, S.; Calixto, J. B ; Yunes, R. A. Estratégias para descobrir novos agentes antifúngicos. IN:Plantas Medicinais sob a ótica da Moderna **Química Medicinal**. (orgs), p. 1-13, 2003.
166. SELITRENNIKOF, C.P. Use of temperature sensitive, protoplast forming *Neurospora crassa strain* for detection of antifungal antibiotics. **Antimicrobiology Agents Chemotherapy**, n. 26, p. 757-65, 1983.
167. FUKUDA,D.; NAKATSUKASA, W.; YAO, R. HUNT, A. **A complex of fungal cell wall inhibitors produced by a mold**, p. 211, 1999.

## **7. ANEXOS**